Die Kopplung zwischen Natrium- und Substrattransport in Bürstensaummembranvesikeln aus dem proximalen Tubulus der Rattenniere:

Beschreibung des L-Glutaminsäure-Transports und der substratinduzierten Natriumbewegung in verschiedenen Transportsystemen

vorgelegt von

Jürgen Seeger

aus Gießen

1983

Frankfurt am Main, 1983

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main
Direktor der Abteilung Physiologie: Prof. Dr. K.-J. Ullrich

Die Kopplung zwischen Natrium- und Substrattransport in Bürstensaummembranvesikeln aus dem proximalen Tubulus der Rattenniere:

Beschreibung des L-Glutaminsäure-Transports und der substratinduzierten Natriumbewegung in verschiedenen Transportsystemen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

vorgelegt von

Jürgen Seeger

aus Gießen

Frankfurt am Main, 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H. J. Müller
Referent: Prof. Dr. K.-J. Ullrich
Korreferenten: Prof. Dr. K. Ring
Prof. Dr. W. Schoeppe

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 1983

Abstract

SEEGER, JÜRGEN:

DIE KOPPLUNG ZWISCHEN NATRIUM- UND SUBSTRATTRANSPORT IN BÜRSTENSAUMMEMBRANVESIKELN AUS DEM PROXIMALEN TUBULUS DER RATTENNIERE: BESCHREIBUNG DES L-GLUTAMINSÄURE-TRANSPORTS UND DER SUBSTRATINDUZIERTEN NATRIUMBEWEGUNG IN VERSCHIEDENEN TRANSPORTSYSTEMEN

An durch eine Ca^{++}-Präzipitationsmethode gewonnenen Bürstensaumvesikeln aus dem proximalen Tubulus der Rattenniere wurde die Existenz eines spezifischen Transportsystems für die saure Aminosäure L-Glutaminsäure nachgewiesen, das L-Glutaminsäure natriumabhängig in die Vesikel transportiert. Hierbei wird die Energie eines einwärts gerichteten Natriumgradienten zur Substratakkumulation genutzt; die natriumabhängige L-Glutaminsäureaufnahme zeigt Sättigung bei steigender Substratkonzentration, Stereospezifität für die L-Form sowie Spezifität für die sauren Aminosäuren.

Versuche zur Potentialabhängigkeit der L-Glutaminsäureaufnahme lassen bei kaliumfreien Vesikeln den elektroneutralen Symport eines Substratmoleküls und eines Natriumions, bei Beladung der Vesikel mit $Kalium^{+}$ den potentialsensiblen Symport eines Substratmoleküls mit drei Natriumionen unter Antiport eines Kaliumions vermuten; hierbei hat die Kaliumbeladung selbst einen stimulierenden Effekt auf die Substrataufnahme.

Ferner gelang für das L-Glutaminsäuresystem der direkte Nachweis der Kopplung von Substrat- und Natriumaufnahme über die Induzierbarkeit eines Natriumeinstromes durch einen einwärts gerichteten Substratgradienten.

Während hier Aussagen zur Stöchiometrie nicht gemacht werden konnten, gelang dies zumindest ansatzweise bei den schon bekannten Transportsystemen für D-Glukose, L-Phenylalanin und anorganisches Phosphat. Für das D-Glukosesystem wurde die Kopplung je eines Substratmoleküls und eines Natriumions gesichert, für die anderen Systeme bedarf die grundsätzlich geeignete dargestellte Methodik weiterer Verbesserungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523704_0044

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methoden	9
1. Membranpräparation und Enzymbestimmung	9
2. Transportstudien und Berechnung	11
a) Versuche zur L-Glutaminsäureaufnahme	11
b) Versuche zur Natriumbewegung	12
Ergebnisse	15
1. Der Effekt von Natriumionen auf die Aufnahme von L-Glutaminsäure	15
2. Bindung der L-Glutaminsäure an die Vesikelmembran	19
3. Beeinflussung der L-Glutaminsäureaufnahme durch die Substratkonzentration	22
4. Spezifität des Transportsystems für L-Glutaminsäure	24
5. Beeinflussung der L-Glutaminsäureaufnahme durch elektrische Potentialdifferenzen - Effekt einer Beladung der Vesikel mit Kalium	26
6. L-Glutaminsäure-induzierte Natriumionen-Bewegung	30
7. Substrat-induzierte Natriumionen-Bewegung in verschiedenen $Natrium^{+}$-Substrat-Kotransportsystemen	32
a) D-Glukosetransportsystem	32
b) L-Phenylalanin-Transportsystem	36
c) Phosphat-Transportsystem	39
d) Bestimmung von Kopplungskoeffizienten bei den untersuchten Systemen	43
Diskussion	47
Zusammenfassung	66
Abkürzungen	68
Literatur	69

Einleitung

Im proximalen Tubulus der Niere werden etwa zwei Drittel der Flüssigkeitsmenge des in den Glomeruli erzeugten Ultrafiltrats sowie die Hauptmenge der darin enthaltenen Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumionen rückresorbiert. Dies geschieht in Form von isotoner Flüssigkeit ("level flow"-Situation) und wird durch energieabhängige, ATP verbrauchende Prozesse vermittelt. So befindet sich in den basallateralen Membranen der Tubuluszellen eine Na^+-K^+-ATPase, die Na^+, und als begleitende Anionen Bicarbonat und Chlorid, in die Zwischenzellspalten befördert; hierbei werden diese hyperton, es strömt Wasser aus dem Tubuluslumen durch die Schlußleisten in die Zwischenzellspalten - wobei NaCl mitgerissen wird - und in das Interstitium.

Im proximalen Tubulus werden auch solche Substanzen, die nicht ausgeschieden werden sollen, wie Zucker und Aminosäuren, vollständig aus dem Primärharn entfernt (bei normaler Blut- und damit auch Glomerulumfiltratkonzentration). Andere Substanzen, deren Ausscheidung zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Blutkonzentration über einen Regelkreis gesteuert wird, wie anorganisches Phosphat, werden nach Maßgabe dieses Regelkreises aus dem Primärharn aufgenommen. Diese Rückresorptionsvorgänge geschehen immer gegen einen Konzentrationsgradienten, sie bedürfen somit auch der Verknüpfung mit einem energieliefernden Prozeß.

Die Mechanismen, die der Rückresorption von Zucker, Aminosäuren und Phosphat zugrunde liegen, sowie die hieran beteiligten treibenden Kräfte sind in den Grundzügen weitgehend bekannt. Bereits 1962 formulierte Crane seine Natrium-Gradienten-Hypothese für den intestinalen Zuckertransport (1, 2), die sich durch Mikroperfusions- und elektrophysiologische Studien auch für die Resorption der oben

genannten Substanzen im proximalen Tubulus als gültig erwiesen hat (3, 4, 5): Ein über der lumenwärts gerichteten Tubuluszellmembran (Bürstensaummembran) bestehender, zelleinwärts gerichteter Natrium-Gradient ermöglicht über eine Kopplung des Natriumionen-Einstroms an die Substrataufnahme über in der Zellmembran lokalisierte substratspezifische Transportsysteme eine Akkumulation des Substrats in der Zelle. Die Substrataufnahme geschieht also ohne direkte Kopplung an energieliefernde Prozesse; es handelt sich hier somit um sekundär aktive Natrium-Substrat-Kotransportsysteme. Die in der basal-lateralen Membran vorhandene Na^+-K^+-ATPase erhält - in einem primär aktiven Prozeß unter ATP-Verbrauch - die intrazelluläre Na^+-Konzentration niedrig und damit den Natrium-Gradienten aufrecht, indem sie Na^+ - wie oben bereits beschrieben - in die Zwischenzellspalten und das basale Labyrinth pumpt. Das akkumulierte Substrat verläßt die Zelle auf der kontraluminalen Seite seinem Konzentrationsgradienten folgend über in der basal-lateralen Membran lokalisierte substratspezifische, aber natriumunabhängige Systeme (Prinzip der erleichterten Diffusion).

Für die einzelnen hier interessierenden Substanzen haben sich dabei noch folgende Besonderheiten ergeben (5, 6): Das in der Bürstensaummembran lokalisierte Transportsystem für Zucker besitzt hohe Natriumspezifität; andere einwertige Kationen führen zu keiner Stimulation der Substrataufnahme. Nur bestimmte Zucker werden transportiert, wobei die molekulare Struktur ausschlaggebend ist (wesentlich sind hierbei das Vorhandensein eines C-6 Atoms sowie einer Ringstruktur und die Anordnung der OH-Gruppen); es liegt jeweils strenge Stereospezifität vor, nur die D-Isomeren werden transportiert. Bei der Aufnahme der aktiv transportierten Zucker aus dem Tubuluslumen wird durch die Kopplung an den Na^+-Einstrom positive Ladung verschoben, im Falle der

D-Glukose sprechen elektrophysiologische Messungen für ein Verhältnis von transportiertem Substrat zu damit aufgenommenen Natriumionen von 1 : 1. Die aktive Zuckeraufnahme wie auch der damit verbundene Natrium$^+$-Einstrom sind durch Phlorrhidzin, ein als Hemmstoff der renalen Glukoserückresorption bekanntes Glykosid, blockierbar. Auf der kontraluminalen Zellseite geschieht der Ausstrom der transportierten Zucker auch über substratspezifische Systeme, aber natriumunabhängig, ohne Ladungsverschiebung und nur in geringem Maße durch Phlorrhidzin hemmbar.

Für die aktive luminale Aufnahme der Aminosäuren konnten mehrere Systeme unterschiedlicher Spezifität für Gruppen von Aminosäuren gefunden werden (Systeme für 1. neutrale, 2. saure, 3. basische Aminosäuren, 4. Iminosäuren, Glycin und neutrale Aminosäuren, 5. Iminosäuren, 6. Glycin und neutrale Aminosäuren, 7. ß-Aminosäuren). Diese Befunde korrelieren gut mit den aus der Klinik bekannten, genetisch bedingten Aminoazidurien, bei denen aufgrund fehlender Rückresorption jeweils bestimmte Gruppen von Aminosäuren ausgeschieden werden (7). Die verschiedenen Systeme beeinflussen sich untereinander nicht direkt, eine Interaktion tritt - wie mit dem Zuckertransportsystem - nur über die gemeinsame Triebkraft, den Na^+-Gradienten, auf.

Alle beschriebenen Systeme besitzen eine geringere Kationen-Spezifität als das Zucker-Transportsystem, auch Lithium$^+$ hat eine, wenn auch nur geringe, stimulierende Wirkung auf die Aminosäureaufnahme. Es liegt eine Stereospezifität des aktiven Transportes für L-Aminosäuren vor, jedoch werden die D-Enantiomorphen mit geringerer Transportrate über dieselben Systeme aufgenommen. Eine Verschiebung von positiver Ladung bei der Aminosäurenaufnahme wird in allen Systemen beobachtet, wobei nach den elektrophysiologischen Messungen im Falle der neutralen und basischen

Aminosäuren je ein Natriumion pro Aminosäure-Molekül, bei den sauren Aminosäuren zwei Natriumionen (oder ein Na^+ und ein H^+) transportiert werden.

Für den kontraluminalen Aminosäureausstrom gilt das oben für die Zucker Gesagte. Eine Ausnahme machen hier die sauren Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure, die auch basal-lateral natriumabhängig und rheogen über einen sekundär aktiven Transportprozeß aufgenommen werden.

Für das anorganische Phosphat hat sich gezeigt, daß die - der Steuerung durch Parathormon unterliegende - Rückresorption im proximalen Tubulus vollständig natriumabhängig ist. Das in der luminalen Membran lokalisierte Natrium$^+$-Kotransportsystem wird durch Arsenat, das bei Untersuchungen an der intakten Niere die Phosphatausscheidung steigert, gehemmt, das Arsenat wird jedoch im Gegensatz zum das Zucker-Transportsystem nur blockierende Phlorrhidzin selbst auch transportiert. Positive Ladung wird bei der Aufnahme von Phosphat nur in einem pH-Bereich verschoben, in dem hauptsächlich $H_2PO_4^-$ vorliegt (pH 6,0); die Aufnahme geschieht bei höherem pH (8,2), wenn hauptsächlich HPO_4^{--} vorliegt, elektroneutral. Das spricht dafür, daß pro Phosphat-Molekül zwei Natriumionen transportiert werden. Basal-lateral verläßt das Phosphat die Zelle natriumunabhängig seinem Konzentrationsgradienten sowie der elektrischen Potentialdifferenz folgend.

Die bis jetzt dargestellten Ergebnisse wurden durch Mikroperfusion und elektrophysiologische Untersuchungen an intakten Tubuli gewonnen. Sie konnten untermauert werden durch Untersuchungen mit isolierten Membranvesikeln aus dem proximalen Tubulus, die nach ihrer Herkunft aus luminaler und basal-lateraler Membran aufgetrennt werden können (8). Diese Vesikel sind osmotisch reaktiv, sie sind

frei von ATP und den nicht plasmamembrangebundenen Enzymen des Zellstoffwechsels (9, 10), und die Bürstensaumvesikel zeigen eine Orientierung, die ihrer physiologischen Anordnung entspricht ("right side out" - das Vesikeläußere entspricht der Zellaußenseite) (11). Sie ermöglichen damit die Untersuchung der membrangebundenen Transportsysteme und deren Triebkräfte unter Ausschluß störender Einflüsse des Zellmetabolismus. Die bei Transportstudien mit diesen Vesikeln gefundenen Ergebnisse unterstützen die oben beschriebene Natrium-Gradienten-Hypothese (als Substrate wurden bei den hier geschilderten Befunden D-Glukose (12), L-Phenylalanin (13) sowie anorganisches Phosphat (14) untersucht; zu den verschiedenen Methoden der Vesikelisolierung (Differentialzentrifugation, trägerfreie Elektrophorese, Percoll-Gradienten-Zentrifugation, Calcium-Präzipitation) sowie der Analyse der Transporteigenschaften (Filtrationstechnik, Säulenchromatographie, fluoreszenzphotometrische Techniken, selektive Elektroden) siehe (8)). Die isolierten Bürstensaummembranvesikel zeigen eine Stimulation der Substrataufnahme in Anwesenheit von Natriumionen. Bereits bei gleicher Na^+-Konzentration innerhalb und außerhalb der Vesikel tritt eine Beschleunigung der Substrataufnahme gegenüber einem natriumfreien, kaliumhaltigen Medium ein, während ein in die Vesikel gerichteter Na^+-Gradient sogar zu einer vorübergehenden Akkumulation des Substrates in den Vesikeln führt ("overshoot"-Phänomen).

Die natriumabhängige Aufnahme der D-Glukose wird durch Phlorrhidzin gehemmt; sie ist potential-sensibel, eine Negativierung des Vesikelinneren führt zu einer Stimulation. Dies paßt zu der Annahme eines Natrium-Glukose-Kotransportes, wobei Untersuchungen der Transportkinetik mit den Vesikeln das bei elektrophysiologischen Messungen gefundene Verhältnis von Natrium$^+$ zu Glukose von 1 : 1 bestätigen.

L-Phenylalanin verhält sich bezüglich der Potentialsensibilität wie D-Glukose, jedoch läßt hier die Transportkinetik im Widerspruch zum elektrophysiologisch bestimmten Natrium-Substrat-Verhältnis von 1 : 1 auf ein Verhältnis von größer als 1 schließen.

Der natriumabhängige Phosphat-Transport in die Bürstensaumvesikel ist durch Arsenat hemmbar. Er zeigt bei pH 7,4 nur sehr geringe Potentialsensibilität (geringe Stimulierung durch Negativierung des Vesikelinneren); dies steht im Einklang mit den oben beschriebenen elektrophysiologischen Befunden, da in diesem pH-Bereich vorwiegend das elektroneutral (mit 2 Natriumionen) transportierte zweiwertige Phosphat vorliegt. Die transportkinetischen Untersuchungen sprechen in einem pH-Bereich von 6 - 8 mit grosser Wahrscheinlichkeit für ein Natrium-Substrat-Verhältnis von 2.

Bezüglich der Natrium-Spezifität stimmen die Ergebnisse der Vesikelstudien mit den Befunden am intakten Tubulus überein: nur im Falle des L-Phenylalanin ist Na^+ bedingt durch Li^+ ersetzbar (die Stimulation durch Li^+ beträgt etwa 20 % der Na^+-Stimulation).

Bei den drei beschriebenen Transportsystemen ließ sich jeweils auch die Induzierbarkeit eines Natriumeinstroms in die Vesikel durch einen vesikeleinwärts gerichteten Substratgradienten nachweisen, ein Effekt, der bei der Postulierung eines $Natrium^+$-Substrat-Kotransportsystems zu fordern ist. Die substratinduzierte Natriumbewegung war jedoch nicht quantitativ auswertbar, da unspezifische Natriumflüsse bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht auszuschließen waren.

Die Membranvesikel aus dem basal-lateralen Labyrinth

zeigen bei der Aufnahme der drei untersuchten Substrate keine Stimulierbarkeit durch Natriumionen (und somit auch kein "overshoot"-Phänomen) sowie keine Potentialsensibilität und Phlorrhidzin hat nur eine sehr geringe Hemmwirkung auf die D-Glukoseaufnahme. Insgesamt sprechen die Befunde dafür, daß, wie aufgrund der Untersuchungen am intakten Tubulus angenommen, die Substrate trägergebunden ihrem Konzentrationsgradienten folgend die kontraluminale Zellmembran passieren.

Vor diesem Hintergrund ist das Vorhaben der vorliegenden Arbeit, an mit einer Ca^{++}-Präzipitationsmethode isolierten Vesikeln aus der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus der Rattenniere mittels einer Filtrationstechnik sowie radioaktiver Markierung von Substraten und Natriumionen die Kopplung zwischen Substrat- und Natriumfluß in den oben genannten Transportsystemen quantitativ zu beschreiben. Unter eindeutigen experimentellen Bedingungen unter Ausschluß aller Faktoren, die eine unspezifische Natriumbewegung hervorrufen könnten, soll der substratinduzierte Natriumfluß als direkter Nachweis der Kopplung zwischen Natrium- und Substrataufnahme gemessen werden und das Verhältnis zwischen bewegten Natriumionen und Substratmolekülen, der Kopplungskoeffizient, bestimmt werden. Hiermit beschäftigt sich der zweite Teil der Arbeit.

Die Frage der Kopplung zwischen Natrium- und Substrateinstrom interessierte uns auch bezüglich der sauren Aminosäuren. Da nach elektrophysiologischen Messungen die Aufnahme dieser Aminosäuren aus dem Tubulus zu einer Depolarisierung der Zellmembran führt, müssen pro Substrat-Molekül mindestens zwei positive Ladungen (zwei Na^+ oder Na^+ plus H^+) transportiert werden. Da das Transportsystem für saure Aminosäuren bisher an Membranvesikeln noch nicht untersucht wurde, beschäftigt sich der erste Teil der Arbeit

zunächst mit der Charakterisierung der Transporteigenschaften des Systems für L-Glutaminsäure, danach folgt der Versuch einer Bestimmung der substratinduzierten Natriumbewegung.

Methoden

1. Membranpräparation und Enzymbestimmung

Für unsere Versuche benutzten wir zur Isolierung der Bürstensaummembranvesikel Nieren von ca. 180 g schweren männlichen "Wistar"-Albinoratten. Die Tiere wurden durch einen Genickschlag getötet, die Nieren sofort entnommen und in eiskalten Mannit/Tris-HCl-Puffer (10 mM Mannit, 2 mM Tris-HCl, pH 7,1) überführt. Die folgenden Präparationsschritte wurden nach einem Schema durchgeführt, das - in Anlehnung an die von Booth und Kenny entwickelte Magnesium-Präzipitations-Methode (15) - im wesentlichen auf der Ausfällung der unerwünschten subzellulären Strukturen durch Calciumionen beruht (16). Hierzu wurde, nach Entfernung der bindegewebigen Nierenkapsel, zunächst die etwa 1 mm dicke Nierenrinde mit einer Rasierklinge abgetrennt und in o.g. Puffer homogenisiert. Diesem Gesamthomogenat wurde kristallines Calciumchlorid auf eine Konzentration von 10 mMol/l zugesetzt. In einem niedrigtourigen Zentrifugationsschritt wurden dann nicht aufgeschlossene Zellteile sowie die durch die Calciumionen präzipitierten Strukturen abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die noch verunreinigten Membranvesikel durch Zentrifugation bei hoher Umdrehungszahl sedimentiert. Sodann wurde der gesamte Präzipitationsschritt einschließlich der beiden Zentrifugationen wiederholt. Die so gewonnene Bürstensaummembranfraktion wurde schließlich in dem für die Transportstudien benötigten Puffer gewaschen und auf eine Konzentration von ca. 10 mg Protein pro ml Puffer gebracht. Die gesamte Präparation wurde im Kühlraum bzw. in Kühlzentrifugen bei +2 - +4 Grad Celsius durchgeführt. Vom Töten der Tiere bis zum Beginn der Transportstudie vergingen dabei etwa 3,5 Stunden.

Zur Kontrolle der Reinheit der Präparation wurde regelmäßig ein Leitenzym der Bürstensaummembran, die alkalische Phosphatase (9), im Gesamthomogenat und in der Bürstensaumfraktion bestimmt. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms wurde im Mittel auf das Zehnfache angereichert.

Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (EC.3.1.3.1.) wurde mit dem LKB-Autoanalysator mit Hilfe des optimierten kinetischen Testes "Merckotest" der Firma Merck, Darmstadt, bei 37 ^{o}C und pH 9,8 mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat durchgeführt.

Zur Berechnung der Enzymanreicherung wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase auf den Proteingehalt von Gesamthomogenat und Membranfraktion bezogen (spezifische Aktivität). Der Proteingehalt wurde mit einer modifizierten Methode nach Lowry (17) mit Rinderalbumin als Standard gemessen.

Die Substanzen für die Herstellung der Präparations- und Transportpuffer und zur Durchführung der Proteinbestimmung stammten bis auf HEPES von der Firma Merck, Darmstadt. HEPES wurde von der Firma Serva, Heidelberg, geliefert.

Zur Vermeidung bakterieller Verunreinigungen wurden alle Lösungen filtriert (Filter von der Firma Sartorius, Göttingen, Porengröße 0,2 μm) und bis zum Versuchsbeginn bei 0 ^{o}C aufbewahrt.

2. Transportstudien und Berechnung

a) Versuche zur L-Glutaminsäureaufnahme

Die mit der Calcium-Präzipitationsmethode gewonnenen und in dem Transportpuffer (in der Regel 300 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES, pH 7,4) aufgenommenen Bürstensaumvesikel wurden bis zu Versuchsbeginn bei 0 °C aufbewahrt. Dann wurden jeweils 20 µl der Membransuspension mit 100 µl eines Inkubationsmediums (Grundzusammensetzung: 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES, pH 7,4, 100 mM Salz, 0,1 mM ^{3}H-markierte L-Glutaminsäure) in einem Eppendorfgefäß schnell gemischt (Zeitpunkt 0') und bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Substrataufnahme nun unterbrochen, indem 20 µl des Gemisches in 1 ml einer eiskalten Stoplösung (100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES, pH 7,4, 150 mM Cholinchlorid) verdünnt wurden. Die Vesikel wurden dann mit Hilfe eines Millipore-Filters (Porengröße 0,6 µm, Firma Sartorius, Göttingen) von Medium und Stoplösung getrennt. Der Filter wurde mit 5 ml der Stoplösung nachgespült und in 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit überführt. Die auf dem Filter befindliche Radioaktivität wurde mit einem Liquid-Scintillation-Counter gemessen.

Um zu unterscheiden, welcher Anteil der so gemessenen Radioaktivität tatsächlich auf Aufnahme des markierten Substrates in die Vesikel und welcher auf Haftung von freiem Substrat am Filter beruhte, wurde zu jeder Versuchsserie ein Ansatz ohne Membranzugabe durchgeführt. Hierbei wurde dem Inkubationsmedium statt der Membransuspension reiner Transportpuffer zugesetzt und dann weiter wie oben beschrieben verfahren. Die so gewonnenen Leerwerte für die vom Filter zurückgehaltene, nicht membranvesikelgebundene Radioaktivität wurden vor Berechnung der aufgenommenen Substratmenge von allen Meßwerten abgezogen. Da bei der Messung der

Filterleerwerte jeweils eine komplette Zeitkurve bestimmt wurde, hätte auch eine eventuelle bakterielle Verunreinigung der Medien durch ein Ansteigen der Leerwerte mit zunehmender Inkubationszeit erkannt werden können.

Die durch Abziehen des Filterleerwertes bereinigten Meßwerte wurden dann in Beziehung gesetzt zu einer Probe mit bekanntem Substratgehalt (hier wurden 5 µl des Transportmediums direkt in die Szintillationsflüssigkeit gegeben). Die so erhaltenen absoluten Werte für die Substrataufnahme konnten dann bei bekannten Proteinkonzentrationen in Aufnahme pro Milligramm Protein umgerechnet werden.

Bei allen Versuchen war die Zugabe an radioaktiv markierter L-Glutaminsäure zum Medium so ausgelegt, daß pro Entnahmezeitpunkt 2 µCi ^{3}H enthalten waren (10 µCi ^{3}H pro 100 µl Membran/Mediumgemisch).

b) Versuche zur Natriumbewegung

Bei den Versuchen zur Natriumbewegung wurde die Membransuspension zunächst eine Stunde bei 25 ^{o}C in einem Medium von folgender Endkonzentration vorinkubiert: 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES, pH 7,4, 95 mM KSCN, 5 mM NaSCN (mit ^{22}Na markiert). Nachdem sich die Vesikel mit dem Medium im Gleichgewicht befanden, wurde die Substrataufnahme durch Zugabe einer Lösung gestartet, die das Substrat in konzentrierter Form - berechnet auf eine Endkonzentration von 2, 5 bzw. 10 mMol/l - enthielt und in der Zusammensetzung ansonsten genau dem Inkubationsmedium entsprach. Hierbei wurde auch die spezifische Aktivität des ^{22}Na außerhalb der Vesikel nicht verändert und die unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden durch Mannit ausgeglichen. Zur Messung der Substrataufnahme wurden ^{3}H-markierte D-Glukose und L-Phenylalanin sowie ^{32}P-markiertes Phosphat verwandt.

Da mit dem Liquid-Scintillation-Verfahren nicht zwischen ^{22}Na und ^{32}P unterschieden werden kann, mußten im Falle des Phosphats zur Bestimmung von Natrium- und Substrataufnahme jeweils Parallelansätze durchgeführt werden, die bei sonst identischer Zusammensetzung in einem Ansatz markiertes Phosphat, im anderen markiertes Natrium$^+$ enthielten. Im Falle von Glukose und Phenylalanin hingegen konnten Substrat und Natrium$^+$ im gleichen Ansatz markiert werden.

Um Einflüsse von Potentialänderungen auf die Natrium$^+$-Verteilung zu verhindern, wurde das System durch Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin (0,1 mg pro mg Protein)(18) - in Anwesenheit von 95 mMol/l Kaliumionen - kurzgeschlossen. Bei den Versuchen mit anorganischem Phosphat als Substrat wurde zusätzlich CFCCP (0,1 mg pro mg Protein) zugesetzt, das die Membran für Protonen durchlässig macht (18) und so pH-Verschiebungen nach Zugabe des Phosphats als $KH_2PO_4^-$ ausgleicht. In der Stoplösung wurde das Cholinchlorid durch 100 mMol/l Magnesiumchlorid ersetzt (die Magnesiumionen sollen die Natriumionen von Bindungsstellen an den Außenseiten der Vesikelmembranen verdrängen). Bei den Versuchen mit Glukose wurde der Stoplösung außerdem Phlorrhidzin (0,5 mMol/l), bei den Versuchen mit Phosphat Arsenat (10 mMol/l) als Inhibitor der Glukose- bzw. Phosphataufnahme zugesetzt. Der Versuchsablauf entsprach ansonsten dem unter 2. a) geschilderten.

Bei der Berechnung der Natrium$^+$-Verschiebung und der Substrataufnahme wurden die Meßwerte der verschiedenen Zeitpunkte - zur besseren Vergleichbarkeit zwischen mehreren Versuchen und zur klaren Darstellbarkeit - zum Teil in Prozent des Wertes nach einer Stunde (Gleichgewichtszustand) ausgedrückt. Im übrigen wurde wie unter 2. a) verfahren.

Die Zugabe an markiertem Natrium und Phosphat war auf eine Konzentration von 1 μCi ^{22}Na bzw. ^{32}P pro Entnahmezeitpunkt (5 μCi ^{22}Na bzw. ^{32}P pro 100 μl Membran/Mediumgemisch) ausgelegt, die Zugabe von markierter D-Glukose und L-Phenylalanin auf eine Konzentration von 2 μCi ^{3}H pro Entnahmezeitpunkt (10 μCi ^{3}H pro 100 μl Membran/Mediumgemisch).

Das zur Herstellung der Inkubationsmedien und Stoplösungen benötigte HEPES stammte von der Firma Serva, Heidelberg, Valinomycin und CFCCP von der Firma Boehringer, Mannheim, alle übrigen Substanzen von der Firma Merck, Darmstadt. Die radioaktiven Substanzen wurden von der Firma NEN, Boston, Mass., USA bezogen.

Ergebnisse

1. Der Effekt von Natriumionen auf die Aufnahme von L-Glutaminsäure

Die Aufnahmegeschwindigkeit von L-Glutaminsäure in die Bürstensaummembranvesikel wird durch die Anwesenheit von Natriumionen beeinflußt (Abb. 1). Gibt man die Membranen in ein Medium, das 100 mMol/l NaCl enthält und erzeugt so einen vesikeleinwärts gerichteten Natriumgradienten, erreicht man bei einer L-Glutaminsäurekonzentration von 0,1 mMol/l eine fünffache Steigerung der initialen Substrataufnahme (Meßwert nach 15 sec) gegenüber einem KCl-haltigen Medium. Hierbei steigt die L-Glutaminsäurekonzentration in den Vesikeln nach zwei Minuten sogar auf das 2,5fache der Außenkonzentration, die durch den in allen Ansätzen identischen Gleichgewichtswert nach zwei Stunden repräsentiert wird ("Overshoot"-Phänomen). Modifiziert man die Bedingungen, indem man durch Vorinkubation für eine innerhalb und außerhalb der Vesikel gleiche Natrium- bzw. Kaliumkonzentration sorgt, sieht man immer noch eine Steigerung der initialen Substrataufnahme in Anwesenheit von Natriumchlorid auf das Doppelte des Wertes in einem KCl-Medium. Hierbei wird der Gleichgewichtswert im NaCl-Ansatz bereits nach einer Minute erreicht. Es kommt unter diesen Bedingungen aber nicht mehr zur Substratakkumulation in den Vesikeln, hierfür ist also der einwärts gerichtete Natriumgradient wesentlich. Im KCl-Medium ist ein Unterschied zwischen Gradienten- und Gleichgewichtsbedingungen nicht feststellbar.

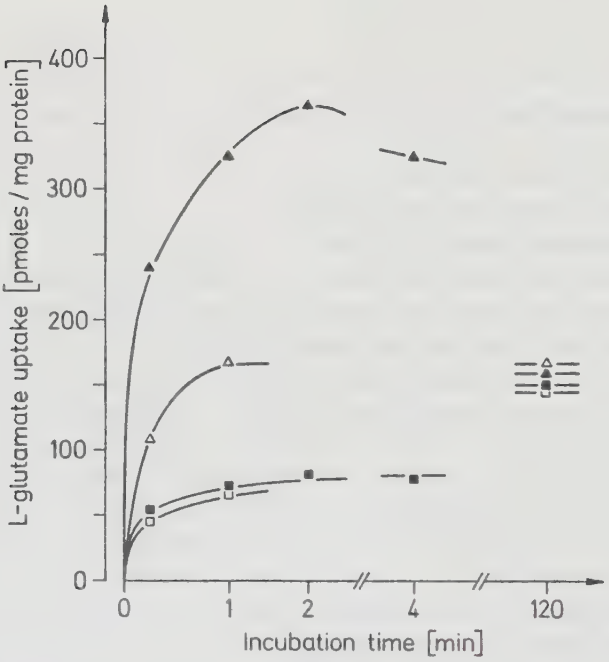


Abb. 1: Effekt von Natriumionen auf die L-Glutaminsäure-aufnahme

Aufnahme in Anwesenheit von Natrium$^+$ oder Kalium$^+$ unter Gradienten- und Gleichgewichtsbedingung. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 0,1 mM L-Glutaminsäure, 100 mM NaCl (▲ , △), bzw. 100 mM KCl (■ , □). Bei △ und □ wurden die Membranen eine Stunde in einem Medium vorinkubiert, das 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES, 100 mM NaCl (△) bzw. 100 mM KCl (□) enthielt.

Der Ersatz von Natrium$^+$ unter Gradientenbedingungen durch andere einwertige Kationen (Kalium$^+$, Lithium$^+$, Cholin$^+$) zeigt (Tab. 1), daß nur Lithium$^+$ eine Stimulierung

der initialen Aufnahme, die etwa 20 % der Na^+-Stimulierung beträgt, aber keinen "Overshoot" bewirkt. Die anderen Kationen sind ohne Effekt gegenüber einem Medium, in dem die Salze durch Mannit ersetzt wurden.

Tabelle 1: Effekt von einwertigen Kationen und Gramicidin D auf die L-Glutaminsäureaufnahme

Das Inkubationsmedium war wie in Abb. 1 zusammengesetzt, die Membranen wurden nicht vorinkubiert. Gramicidin D wurde der Membransuspension in einer Konzentration von 5 µg/mg Protein (gelöst in Äthanol) zugesetzt. Den übrigen Ansätzen wurde die entsprechende Menge Äthanol zugesetzt (1 µl pro 100 µl Medium).

Salz im Inkubationsmedium (jeweils 100 mMol/l)	L-Glutaminsäureaufnahme (pmol/15 s/mg Protein)
NaCl	198
NaCl + Gramicidin D	98
KCl	35
KCl + Gramicidin D	32
LiCl	69
Cholinchlorid	34
Mannit (200 mMol/l)	37

Tabelle 1 zeigt auch, daß Gramicidin D, das aufgrund seiner ionophoren Eigenschaft sowohl den Natrium- als auch den Kaliumgradienten zusammenbrechen läßt (18), zum Verschwinden des "Overshoots" im NaCl-Medium führt und dabei die Natriumwirkung auf den Effekt unter Gleichgewichtsbedingungen reduziert. Unter Kaliumgradientenbedingung hat Gramicidin D keine Wirkung.

Die dargelegten Ergebnisse deuten darauf hin, daß in der Bürstensaummembran ein System existiert, das in Anwesenheit von Natriumionen eine Beschleunigung der L-Gluta-

minsäureaufnahme in die Vesikel bewirkt. Hierbei ist zum einen schon unter Gleichgewichtsbedingungen für die untersuchten Salze eine Stimulation durch Natriumionen gegenüber anderen Kationen zu beobachten, zum anderen wird ein vesikeleinwärts gerichteter Natriumgradient zur vorübergehenden Akkumulation von L-Glutaminsäure in den Vesikeln genutzt. Der Zusatz von Gramicidin D zur Membransuspension führt unter Natriumgradientenbedingungen bei Inkubationsbeginn zum sehr schnellen Einstrom der Natriumionen und damit zum raschen Zusammenbrechen des Gradienten. Daß dies auch den "Overshoot"-Effekt verschwinden läßt, zeigt an, daß zur Akkumulation von Substrat in den Vesikeln die Energie des Natriumgradienten über eine direkte Flußkopplung zwischen Natrium- und L-Glutaminsäureeinstrom genutzt wird. Dies ist in Anwesenheit von Gramicidin D nicht mehr möglich, da jetzt die Natriumionen sehr viel schneller über andere Wege in die Vesikel einströmen können. Wäre das "Overshoot"Phänomen bedingt durch die Änderung der Potentialdifferenz beim Einstrom der Natriumionen unter Gradientenbedingung über vom Transportsystem unabhängige Kanäle, so wäre nach Zugabe von Gramicidin D eine weitere Stimulation der Substrataufnahme zu erwarten.

2. Bindung der L-Glutaminsäure an die Vesikelmembran

Um eine eventuelle Bindung der L-Glutaminsäure an die Vesikelmembran zu erkennen und um festzustellen, welcher Anteil der gemessenen Substrataufnahme auf solcher Bindung und welcher auf tatsächlicher Aufnahme ins Vesikellumen beruht, wurde die Aufnahme bei unterschiedlicher Osmolarität des Mediums gemessen. Diese wurde variiert durch Zugabe verschiedener Mengen Saccharose, wobei neben dem Medium auch die Stoplösung auf die entsprechende Osmolarität eingestellt wurde. Da die Vesikelmembranen für Saccharose kaum permeabel sind, führt eine Erhöhung der Saccharosekonzentration im Medium zu einer Schrumpfung der Vesikel, zu einer Abnahme des intravesikulären Volumens und damit auch zu einer Reduzierung der Menge der hierin gelösten Substanzen, während an die Membran gebundene Stoffe nicht beeinflußt werden.

Die Messungen unter $Natrium^+$-Gradientenbedingungen zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen dem L-Glutaminsäuregehalt der Vesikel nach 30 min und der Osmolarität des Außenmediums (Abb. 2). Die Auftragung der Substrataufnahme gegen den reziproken Wert der Osmolarität ermöglicht hierbei eine Extrapolation auf eine unendlich hohe Osmolarität mit einem gegen Null gehenden Vesikelvolumen. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinate deutet auf eine Bindung der L-Glutaminsäure an die Membran hin, die etwa 30 % der unter normalen Versuchsbedingungen gemessenen Gleichgewichtswerte beträgt.

Diese Bindung dürfte zum Teil auf einer auch bei L-Phenylalanin vermuteten Lösung der Aminosäure in der Lipidphase der Membran beruhen (13), eine weitere Rolle könnte auch eine Bindung der negativ geladenen L-Glutaminsäure an positive Valenzen der Membranproteine spielen.

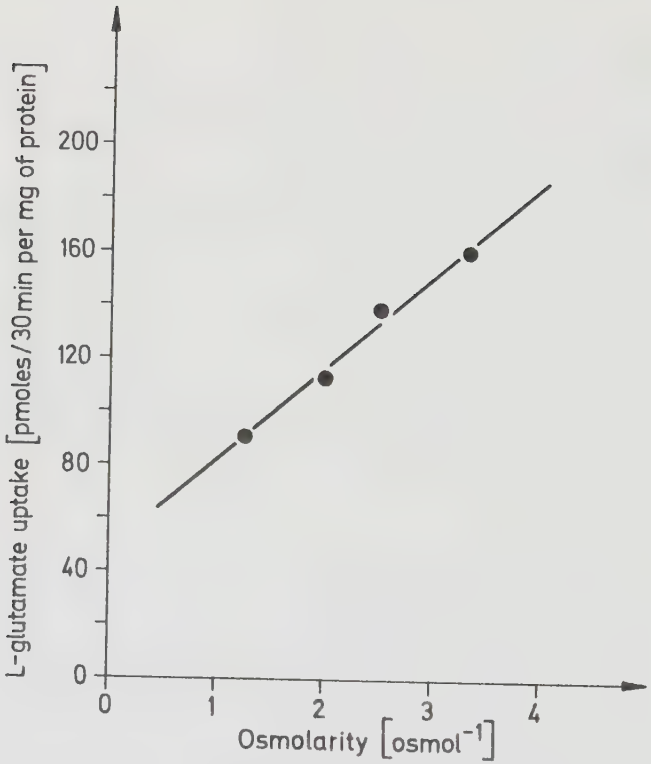


Abb. 2: Effekt der Mediumosmolarität auf die L-Glutaminsäureaufnahme

Die Vesikel wurden jeweils in 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4 aufgenommen.
Die Inkubationsmedien enthielten 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1 mM L-Glutaminsäure und die zur Einstellung der Osmolarität erforderliche Menge Saccharose.
Die Gerade wurde mit der Methode der kleinsten Quadrate errechnet.

Es muß jedoch auch berücksichtigt werden, daß diese Methode zur Berechnung der Membranbindung mit einer gewissen Unsicherheit verbunden ist, da über einen großen Bereich der Mediumosmolarität extrapoliert wird. Die in denselben Ansätzen mitgemessene D-Glukoseaufnahme erbrachte bei Auftragung auf gleiche Weise eine durch Null gehende Gerade (keine Abbildung). Dies paßt zu der Annahme, daß D-Glukose nicht an die Membran gebunden wird (12).

Eine weitere Abklärung der beobachteten Membranbindung erschien uns nicht nötig, da diese Bindung bei der Betrachtung des natriumabhängigen, spezifischen Teiles der L-Glutaminsäureaufnahme nicht gesondert berücksichtigt werden muß. Dieser Anteil der Aufnahme ist definiert als Differenz zwischen der Aufnahme in einem Natrium- und in einem Kaliummedium, und die Bindung geht somit in den unspezifischen Teil (Aufnahme im kaliumhaltigen Medium) ein (eine unterschiedliche Bindung in Natrium- und Kaliummedien wurde nicht beobachtet).

3. Beeinflussung der L-Glutaminsäureaufnahme durch die Substratkonzentration

Die bisher aufgezeigten Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß für L-Glutaminsäure in der Bürstensaummembran ein sekundär aktives $Natrium^{+}$-Kotransport-System existiert. Eine weitere Forderung an ein solches System ist, daß die Substrataufnahme bei steigender Substratkonzentration eine Sättigung zeigt, die abhängig ist von den Transporteigenschaften und der Zahl der spezifischen Bindungsstellen in diesem System. Um das zu untersuchen, wurde den Inkubationsmedien unter Gradientenbedingung sowohl für Natrium- als auch für Kaliumchlorid Substrat in steigenden Konzentrationen zugesetzt.

Wie Abbildung 3 zeigt, steigt hierbei im Kaliummedium die initiale L-Glutaminsäureaufnahme proportional zur Konzentration an, während im Natriummedium eine Sättigung zu beobachten ist, wobei der natriumabhängige Teil der Aufnahme (Werte im Natriummedium minus Werte im Kaliummedium) bei steigender Substratkonzentration schließlich konstant wird.

Während also die Substrataufnahme in einem Kaliumchloridmedium einem Diffusionsvorgang entspricht, scheint die in Anwesenheit von Natriumionen stimulierte Aufnahme durch ein Transportsystem von definierter Kapazität und Sättigungscharakteristik vermittelt zu werden.

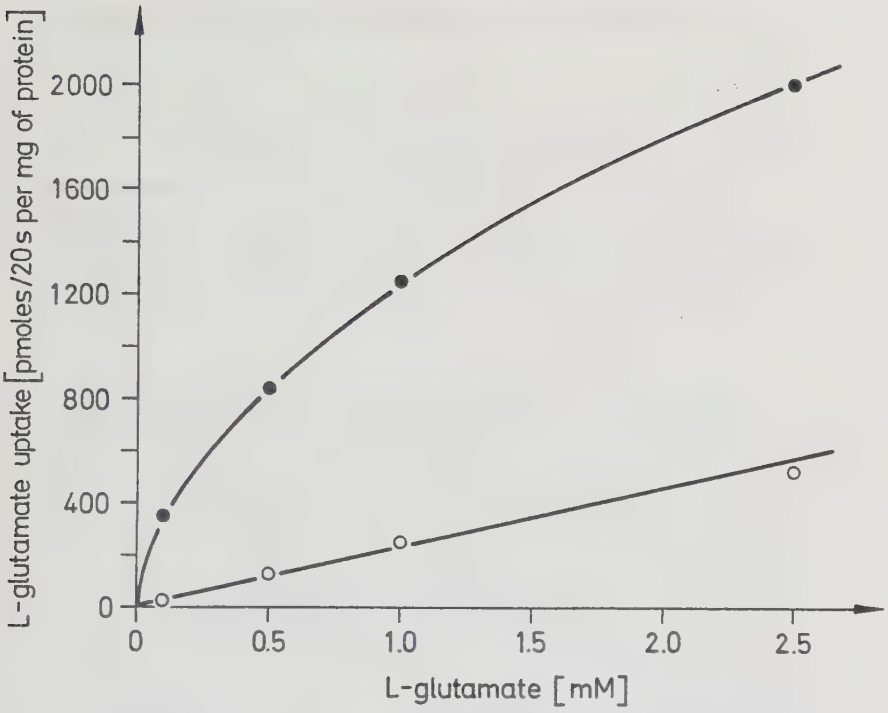


Abb. 3: Sättigung der L-Glutaminsäureaufnahme

Die Inkubationsmedien enthielten 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 0,1 - 2,5 mM L-Glutaminsäure, 100 mM NaCl (●) bzw. 100 mM KCl (○). Die Vesikel wurden in 300 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4 aufgenommen.

4. Spezifität des Transportsystems für L-Glutaminsäure

Die Spezifität des in der Bürstensaummembran vorliegenden Systems für L-Glutaminsäure wurde untersucht, indem die Hemmung der Substrataufnahme durch Zugabe (nicht radioaktiv markierter) anderer Aminosäuren in zehnfach höherer Konzentration gemessen wurde. Hierbei wurden Vertreter aus den Gruppen von Aminosäuren untersucht, für die nach den bereits erwähnten in vivo-Versuchen verschiedene Transportsysteme existieren (6).

Die Versuche wurden unter Natriumgradientenbedingungen durchgeführt; um Einflüsse der untersuchten Aminosäuren auf die L-Glutaminsäureaufnahme durch Änderungen von Potentialdifferenzen zu verhindern, wurde den Inkubationsmedien Kaliumchlorid (5 mMol/l) und das Kaliumionophor Valinomycin (18) zugesetzt.

Tabelle 2 zeigt, daß die initiale L-Glutaminsäureaufnahme verglichen mit einer Kontrolle ohne Aminosäurezusatz durch die stereoisomere D-Glutaminsäure nicht verringert wird. Auch Vertreter aus den Gruppen der basischen und der neutralen Aminosäuren sowie der Pyrrolidincarbonsäuren und Glycin haben keine Hemmwirkung. Die saure Aminosäure Asparaginsäure reduziert hingegen die L-Glutaminsäureaufnahme auf 20 % des Kontrollwertes. Daß es sich hierbei nicht um einen unspezifischen Effekt auf die Membranvesikel handelt, zeigt die gegenüber der Kontrolle unveränderte D-Glukoseaufnahme. Zugabe von D-Glukose anstatt einer der Aminosäuren verringert nur die Aufnahme der radioaktiv markierten D-Glukose, hat aber keine Wirkung auf die L-Glutaminsäureaufnahme.

Die leichte Stimulierung der L-Glutaminsäureaufnahme, die in unterschiedlichem Maß nach Zugabe aller nicht hem-

menden Aminosäuren zu beobachten ist, läßt sich als Volumeneffekt erklären: Durch rasche Aufnahme der in relativ hoher Konzentration zugesetzten Aminosäuren tritt eine vorübergehende Schwellung der Vesikel und ein damit einhergehender Einstrom der L-Glutaminsäure über den Diffusionsweg ein. Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, daß in der Bürstensaummembran ein System für die sauren Aminosäuren existiert, das stereospezifisch (L-Form bevorzugt) deren Aufnahme in die Vesikel ermöglicht, andere Aminosäuren oder Zucker jedoch nicht transportiert.

Tabelle 2: Effekt von verschiedenen Aminosäuren und D-Glukose auf die L-Glutaminsäureaufnahme

Die Inkubationsmedien enthielten jeweils 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 95 mM NaCl, 5 mM KCl, Valinomycin (0,1 mg pro mg Protein in Äthanol (1 µl pro 100 µl Medium)), 0,1 mM L-Glutaminsäure, 0,1 mM D-Glukose, 1 mM der angegebenen Aminosäure bzw. D-Glukose. Die Vesikel wurden in 300 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4 aufgenommen.

Zugesetzte Aminosäure	L-Glutaminsäure-aufnahme (pmol/15 s/mg Protein)	D-Glukose-aufnahme (pmol/15 s/mg Protein)
Kontrolle ohne Zusatz	158	77
D-Glutaminsäure	188	76
L-Asparaginsäure	30	67
L-Arginin	198	68
L-Lysin	201	69
L-Glutamin	177	70
Glycin	215	81
L-Prolin	181	68
L-Histidin	191	77
L-Alanin	182	78
D-Glukose	162	50

5. Beeinflussung der L-Glutaminsäureaufnahme durch elektrische Potentialdifferenzen - Effekt einer Beladung der Vesikel mit Kalium

Ein weiterer Aspekt bei der Betrachtung des L-Glutaminsäure-Transportsystems ist die Frage der Potentialsensibilität der Substrataufnahme. Um diese zu untersuchen, wurden durch Änderungen der Zusammensetzung der Inkubationsmedien und des Vesikelinneren unterschiedliche Potentialdifferenzen über den Vesikelmembranen erzeugt und die L-Glutaminsäureaufnahme unter diesen Bedingungen gemessen.

Der Aufbau einer Potentialdifferenz wurde zum einen erreicht durch Austausch des im Natriumsalz vorliegenden Anions. Ersatz des Chlorids durch das besser membrangängige Thiocyanat erzeugt unter Gradientenbedingungen eine negative Ladung der Vesikelinnenseite, da Thiocyanat schneller in die Vesikel fließt als die Natriumionen. Ersatz des Chlorids durch Sulfat bewirkt dagegen eine positive Ladung, da die Vesikelmembran hierfür wesentlich weniger permeabel ist als für Natriumionen (19).

Zum anderen wurde eine Potentialdifferenz erzeugt durch Aufbau eines von der Vesikelaußenseite nach innen oder umgekehrt gerichteten Kaliumgradienten und Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin (18). Hierbei entsteht durch Ein- bzw. Ausströmen der Kaliumionen eine positive bzw. negative Ladung des Vesikelinneren, da als Anion hierbei Cyclamat benutzt wurde, für das die Membran kaum permeabel ist.

Tabelle 3 zeigt, daß ein Austausch des Anions unter Natriumgradientenbedingungen und die damit verbundene Negativierung oder Positivierung des Vesikelinneren keine signifikante Änderung der initialen L-Glutaminsäureaufnahme bewirkt. Auch in den Vergleichsmedien unter Kaliumgradientenbedingungen zeigt sich kein signifikanter Effekt.

Tabelle 3: Effekt von verschiedenen Anionen auf die L-Glutaminsäureaufnahme

Die Inkubationsmedien enthielten jeweils 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 100 mM des Salzes, 0,1 mM L-Glutaminsäure.
Die Vesikel wurden in 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4 aufgenommen.

Salz im Inkubationsmedium (jeweils 100 mMol/l)	L-Glutaminsäureaufnahme (pmol/15 s/mg Protein)
NaCl	118
NaSCN	88
Na_2SO_4 (50 mMol/l + 50 mMol/l Mannit)	100
KCl	24
KSCN	34
K_2SO_4 (50 mMol/l + 50 mMol/l Mannit)	25

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Versuche mit vesikeleinwärts bzw. -auswärts gerichteten Kaliumdiffusionspotentialen dargestellt. Ein einwärts gerichteter Kaliumgradient (Tab. 4A) wurde erzeugt, indem nach dem normalen Präparationsschema behandelte (also kaliumfreie) Vesikel in kaliumcyclamathaltige Medien gegeben wurden. Hierbei hat - in Anwesenheit eines ebenfalls nach innen gerichteten Natriumgradienten - die Zugabe von Valinomycin und die damit verbundene positive Ladung der Vesikelinnenseite keine Auswirkung auf die L-Glutaminsäureaufnahme. Die zum Vergleich gemessene D-Glukoseaufnahme wird unter Valinomycin gehemmt.

Zur Erzeugung eines von der Vesikelinnenseite nach aussen gerichteten Kaliumgradienten (Tabelle 4B) wurden die Membranvesikel in einem kaliumcyclamathaltigen Transportpuffer präpariert und es wurden kaliumfreie Medien verwendet (die angegebene Konzentration von 8 mMol/l Kaliumcyclamat im Inkubationsmedium entsteht durch die Zugabe der Mem-

bransuspension). Diese Versuche ergaben eine nur geringe (etwa 5 %), aber gut reproduzierbare Steigerung der L-Glutaminsäureaufnahme durch Zusatz von Valinomycin und die hiermit bewirkte negative Ladung der Vesikelinnenseite; die Glukoseaufnahme zeigte die erwartete Steigerung auf annähernd das Doppelte.

Eine sehr viel auffälligere Stimulierung der initialen L-Glutaminsäureaufnahme zeigt sich beim Vergleich der Werte unter einwärts und auswärts gerichtetem Kaliumgradienten: Bei Vorbeladung der Vesikel mit Kaliumcyclamat steigen diese Werte unabhängig von der Anwesenheit von Valinomycin auf etwa das Dreifache der Aufnahme der Vesikel, deren Innenseite frei von Kaliumionen ist. Für die Glukoseaufnahme findet sich keine solche Veränderung.

Tabelle 4: Effekt von Valinomycin-induzierten Kaliumdiffusionspotentialen und $Kalium^+$-Vorbeladung auf die L-Glutaminsäureaufnahme; Vergleich mit D-Glukoseaufnahme

A) Die Inkubationsmedien enthielten jeweils 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, Natrium- und Kaliumcyclamat in der jeweils angegebenen Konzentration, 0,1 mM L-Glutaminsäure, 0,1 mM D-Glukose, Valinomycin (0,1 mg pro mg Protein) in Äthanol bzw. Äthanol ohne Valinomycin (1 µl pro 100 µl Medium).
Die Vesikel wurden in 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4 aufgenommen.

Salz im Inkubationsmedium	L-Glutaminsäureaufnahme (pmol/15 s/mg Protein)	D-Glukoseaufnahme (pmol/15 s/mg Protein)
50 mMol/l Kaliumcyclamat 50 mMol/l Natriumcyclamat	309	99
50 mMol/l Kaliumcyclamat 50 mMol/l Natriumcyclamat + Valinomycin	302	67
100 mMol/l Kaliumcyclamat	53	17

B) Inkubationsmedien wie unter A)
Die Vesikel wurden in 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 50 mM Kaliumcyclamat aufgenommen.

Salz im Inkubationsmedium	L-Glutaminsäure-aufnahme (pmol/15 s/mg Protein)	D-Glukose-aufnahme (pmol/15 s/mg Protein)
50 mMol/l Natriumcyclamat 8 mMol/l Kaliumcyclamat	918	100
50 mMol/l Natriumcyclamat 8 mMol/l Kaliumcyclamat + Valinomycin	967	184

Aufgrund der angeführten Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Anionen sowie mit einem vesikeleinwärts gerichteten Kaliumgradienten scheint die L-Glutaminsäureaufnahme nicht potentialsensibel zu sein, es scheint also unter den gewählten Natriumgradientenbedingungen ein elektroneutraler Substrat-Natrium^{+}-Komplex transportiert zu werden. Die nach Vorbeladung der Vesikel mit Kaliumionen sich zeigende geringe Stimulierung der Aufnahme durch eine Negativierung der Innenseite steht hierzu jedoch im Widerspruch. Die hierbei außerdem auftretende deutliche Steigerung der initialen Aufnahmerate gegenüber kaliumfreien Vesikeln scheint auf einer Beeinflussung des L-Glutaminsäuresystems zu beruhen, da die D-Glukoseaufnahme nicht verändert wird.

6. L-Glutaminsäure-induzierte Natriumionen-Bewegung

Aus den in Abschnitt 1 gezeigten Ergebnissen wurde gefolgert, daß die L-Glutaminsäureaufnahme in die Bürstensaummembranvesikel über eine Flußkopplung mit einströmenden Natriumionen durch die Energie eines Natriumgradienten angetrieben wird und auf diese Weise eine Akkumulation der L-Glutaminsäure in den Vesikeln erreicht wird. Trifft dies zu, so muß man erwarten, daß in einem solchen $Natrium^+$-Substrat-Kotransportsystem im umgekehrten Fall auch die Natriumaufnahme in die Vesikel durch einen Substratgradienten beschleunigt wird.

In dem bisher beschriebenen Versuchsaufbau (Natriumgehalt der Medien 100 mMol/l) waren jedoch die unspezifischen Natriumflüsse durch die Membran viel zu groß im Verhältnis zu der relativ geringen durch die Substrataufnahme bewegten Natriummenge, als daß diese mit unseren Methoden hätte gemessen werden können. (Nach Untersuchungen von Murer et al. mit Bürstensaummembranvesikeln aus Rattendarm und -niere geschieht der Natriumeinstrom hauptsächlich über ein passives, elektroneutrales Natriumionen/Protonen-Austauschsystem. (20)) Daher wurde in den im folgenden beschriebenen Versuchen der Natriumgehalt der Inkubationsmedien auf 5 mMol/l reduziert, wobei gerade noch eine natriumstimulierte L-Glutaminsäureaufnahme zu beobachten ist. Außerdem wurde der Versuchsablauf wie beschrieben verändert (Methoden, Abschnitt 2 b), um unspezifische Natriumbewegungen so weit wie möglich zu verhindern.

Mit diesem veränderten Vorgehen konnte dann die erwartete Bewegung der Natriumionen als Verschiebung aus dem Gleichgewicht in die Vesikel beobachtet werden. Wie Tabelle 5 zeigt, hängt das Ausmaß der Verschiebung von der Konzentration des zugegebenen Substrats ab; die stereoisomere

D-Glutaminsäure kann diesen Effekt nicht erzielen.

Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme einer Flußkopplung zwischen L-Glutaminsäure und Natriumionen bei der natriumabhängigen L-Glutaminsäureaufnahme. Weitergehende Untersuchungen zur Kopplung zwischen Natrium- und Substratfluß, die Klärung der Frage nach dem Kopplungskoeffizient, waren mit großen experimentellen Schwierigkeiten behaftet. So war bei der gewählten Natriumkonzentration von 5 mMol/l die natriumstimulierte L-Glutaminsäureaufnahme gegenüber der unspezifischen Aufnahme zu klein, um quantitativ ausgewertet werden zu können. Andererseits wurden bei höheren Natriumkonzentrationen die durch das Transportsystem bewegten Natriumionen im Verhältnis zur Gesamtmenge zu gering. Diese Schwierigkeiten waren bei den anderen untersuchten Systemen geringer. Die Versuche mit den D-Glukose-, L-Phenylalanin- und Phosphatsystemen sind im folgenden Kapitel geschildert.

Tabelle 5: L-Glutaminsäure-induzierte Natriumionen-Bewegung

Die Vesikel wurden 1 h bei 25 °C in dem Medium vorinkubiert (100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 95 mM KSCN, 5 mM NaSCN, 0,1 mg Valinomycin pro mg Protein (in Äthanol, 1 µl pro 100 µl Medium)).
Zum Zeitpunkt 0' Zugabe des Substrates in der angegebenen Endkonzentration.

Substrat-Zugabe zum Zeitpunkt 0'	Na^+-Gehalt der Vesikel nach 15 s (nmol/mg Protein)
5 mMol/l L-Glutaminsäure	10,6
10 mMol/l L-Glutaminsäure	12,1
10 mMol/l D-Glutaminsäure	8,9

7. Substrat-induzierte Natriumionen-Bewegung in verschiedenen Natrium$^+$-Substrat-Kotransportsystemen

Ziel der weiteren Untersuchung der Kopplung zwischen Substrat- und Natriumionenfluß an den durch Versuche mit Membranvesikeln bereits gut charakterisierten Natrium$^+$-Kotransportsystemen für D-Glukose, L-Phenylalanin und anorganisches Phosphat war, in diesen Systemen mit der bereits geschilderten Methodik - also unter weitgehendem Ausschluß aller Störfaktoren - den klaren Nachweis der Induzierbarkeit eines Natriumflusses durch den Substrateinstrom über das Transportsystem zu führen. Insbesondere sollte hierbei der Kopplungskoeffizient aus Natrium- und Substrataufnahme untersucht und mit kinetisch ermittelten Zahlen für die drei Systeme verglichen werden (siehe Abschnitt 7 d).

a) D-Glukose-Transportsystem

Für das D-Glukosesystem existiert mit dem Glykosid Phlorrhidzin ein spezifischer Hemmstoff, der in entsprechender Konzentration die Glukoseaufnahme über dieses System völlig blockiert und damit auf die Aufnahme via unspezifischer Wege (= Aufnahme in natriumfreien Medien) reduziert (12). Dadurch ist es möglich, bei unveränderter Zusammensetzung des Mediums, die Natriumbewegungen bei arbeitendem und bei gehemmtem System zu untersuchen.

In Abbildung 4 ist die unter verschiedenen Bedingungen gemessene D-Glukoseaufnahme (Abb. 4 b) und die gleichzeitig registrierte Natriumbewegung (Abb. 4 a) dargestellt. Es zeigt sich, daß bei Zugabe von D-Glukose eine von der Glukosekonzentration (2, 5, 10 mMol/l) abhängige Natriummenge aus dem Gleichgewicht in die Vesikel verschoben wird, von wo aus sie innerhalb einer Stunde zum allen Ansätzen

gemeinsamen Gleichgewichtswert zurückkehrt. Die Zugabe von Phlorrhidzin zum Inkubationsmedium führt, wie oben beschrieben, zur Blockierung des Systems und zur Reduzierung der D-Glukoseaufnahme und bewirkt damit ein Verschwinden des Natriumeinstroms.

Das Antibiotikum Nigericin, das die Vesikelmembran unter anderem für Natriumionen permeabel macht (18), hat unter den gewählten Versuchsbedingungen (Natriumkonzentration in den Vesikeln und im Medium gleich) keinen Einfluß auf die D-Glukoseaufnahme, verhindert aber durch seine ionophore Eigenschaft die vorher beobachtete Erhöhung der Natriumkonzentration in den Vesikeln über einen erleichterten Efflux.

Setzt man statt D-Glukose die stereoisomere L-Glukose zu, deren Aufnahme in die Vesikel im Bereich der D-Glukoseaufnahme unter Phlorrhidzinhemmung liegt, so läßt sich keine signifikante Verschiebung der Natriumionen beobachten.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Vesikel bei Vorliegen eines einwärts gerichteten Substratgradienten in der Lage sind, Natrium$^+$ zu akkumulieren. Der Phlorrhidzineffekt sowie der fehlende Na^+-Einstrom bei Zugabe von L-Glukose belegen, daß diese Erhöhung der intravesikulären Natriumkonzentration durch das D-Glukosetransportsystem vermittelt wird; die Nigericinwirkung zeigt, daß sie nicht auf einer Bindung der Natriumionen an Glukose oder auf einem osmotischen Effekt beruht.

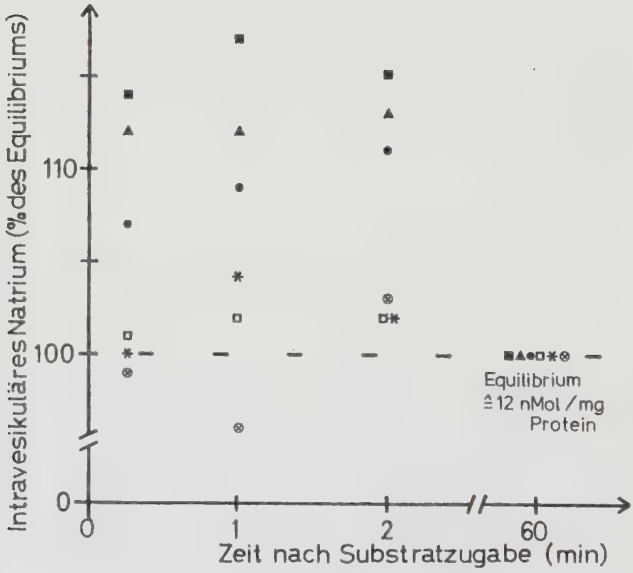
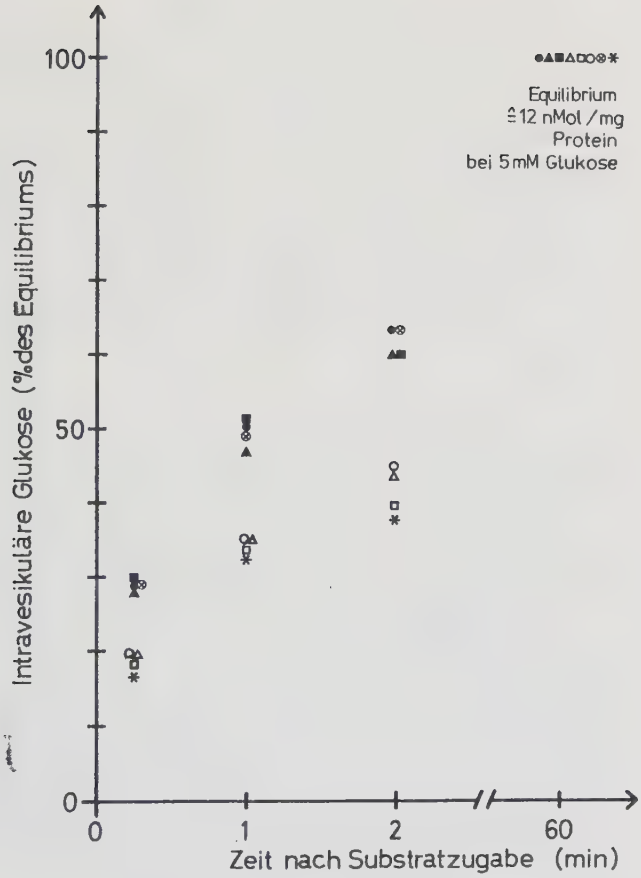


Abb. 4: Einfluß eines Glukosegradienten auf die Natriumverteilung

Die Vesikel wurden jeweils 1 h bei 25 °C in folgendem Medium vorinkubiert:
100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 95 mM KSCN, 5 mM NaSCN, 0,1 mg Valinomycin pro mg Protein (in Äthanol, 1 µl pro 100 µl Medium).

Abb. 4 a zeigt die Veränderungen des Natriumgehalts der Vesikel.



Beim Zeitpunkt 0' Zugabe von D-Glukose auf eine Endkonzentration von 2 mMol/l (●,○), 5 mMol/l (▲,△) bzw. 10 mMol/l (■, □, ⊗).
bei ○, △, □ enthielt das Medium 1 mMol/l Phlorrhidzin, bei ⊗ 10 µg Nigericin pro mg Protein (in Äthanol, 1 µl pro 100 µl Medium, die übrigen Ansätze enthielten die gleiche Menge Äthanol).
Bei ✱ Zugabe von 10 mMol/l L-Glukose statt D-Glukose.
Abb. 4 b zeigt die gleichzeitig gemessene Substrataufnahme (jeweils in Prozent des Wertes nach einer Stunde)

b) L-Phenylalanin-Transportsystem

Für das L-Phenylalaninsystem ist kein dem Phlorrhidzin entsprechender spezifischer Hemmstoff bekannt. In den folgenden Versuchen wurde daher die Aufnahme in natriumfreiem Medium als Äquivalent für die Aufnahme unter Phlorrhidzinhemmung im D-Glukosesystem angesehen. Eine Bestimmung des Natriumflusses bei nicht arbeitendem System konnte so natürlich nicht durchgeführt werden; wir setzten hier voraus, daß eine vom natriumabhängigen Transportsystem unabhängige, aber L-Phenylalanin-induzierte Natriumbewegung nicht stattfindet.

Abbildung 5 zeigt wieder die jeweils gleichzeitig gemessene L-Phenylalaninaufnahme (Abb. 5 b) und Verschiebung der Natriumionen (Abb. 5 a). Die Zugabe des L-Phenylalanins zum Zeitpunkt O' bewirkt eine substratkonzentrationsabhängige Zunahme der intravesikulären Natriumkonzentration, die nach einer Stunde wieder den Gleichgewichtswert erreicht. (Die Ergebnisse der Versuche bei Zugabe von 2 mMol/l L-Phenylalanin waren nicht verwertbar, da hier die natriumabhängige Aufnahme zu gering war). Die Zeitkurve der Natriumbewegung zeigt hierbei einen anderen Verlauf als nach D-Glukosezugabe: Die intravesikuläre Natriumkonzentration steigt nach dem 15 sec-Meßwert nicht weiter an, so daß man nicht ausschließen kann, daß zu diesem Zeitpunkt bereits das Maximum überschritten ist.

Enthält das Inkubationsmedium Nigericin, so wird die L-Phenylalaninaufnahme nicht beeinflußt, die Akkumulation der Natriumionen in den Vesikeln wird jedoch beseitigt.

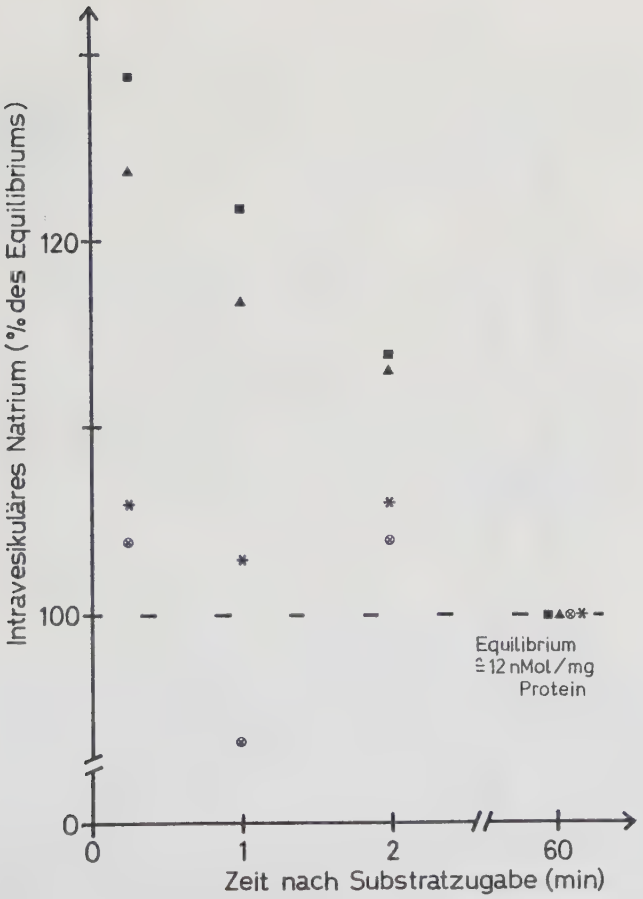
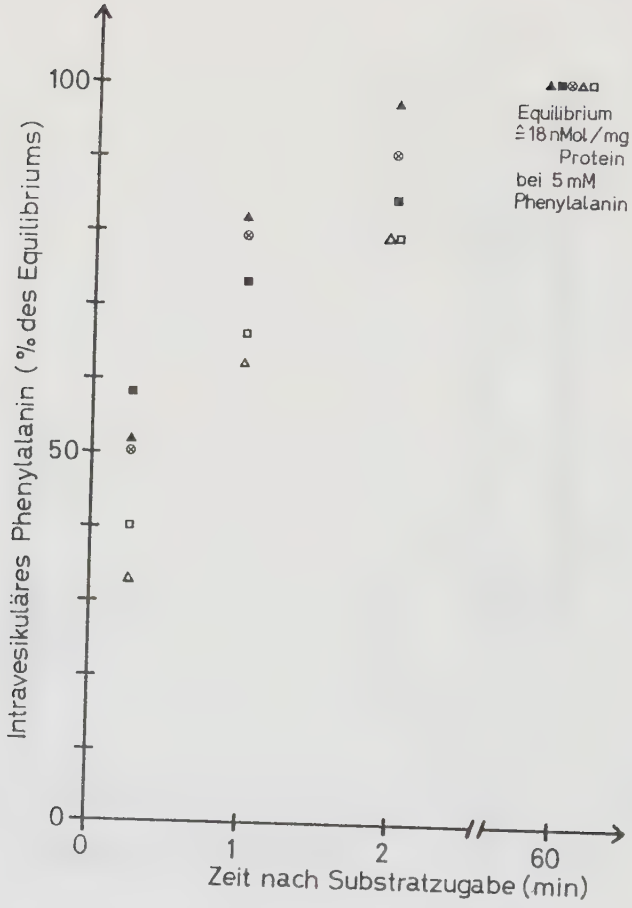


Abb. 5: Einfluß eines Phenylalaningradienten auf die Natriumverteilung.

Die Vesikel wurden jeweils wie in Abb. 4 beschrieben vorinkubiert.
Die Medien enthielten bei ▲ , ■ , ⊗ , ✱ 95 mM KSCN, 5 mM NaSCN, bei △ , □ 100 mM KSCN.
Abb. 5 a zeigt die Veränderungen des Natriumgehalts der Vesikel.



Beim Zeitpunkt 0' Zugabe von L-Phenylalanin auf eine Endkonzentration von 5 mMol/l (▲, △) bzw. 10 mMol/l (■, □, ⊗).
Bei ⊗ enthielt das Medium Nigericin (s. Abb. 4)
Bei ✱ Zugabe von 10 mMol/l D-Phenylalanin statt L-Phenylalanin.

Abb. 5 b zeigt die gleichzeitig gemessene Substrataufnahme (jeweils in Prozent des Wertes nach einer Stunde).

Ersatz des L-Phenylalanin durch das stereoisomere D-Phenylalanin führt zu keiner signifikanten Natriumbewegung. Die Substrataufnahme wurde hierbei aus Mangel an radioaktiv markiertem D-Phenylalanin nicht gemessen; sie liegt nach früheren Untersuchungen im Bereich der L-Phenylalaninaufnahme in Abwesenheit von Natrium (13).

Die Ergebnisse lassen die gleichen Rückschlüsse wie im Fall des D-Glukosesystems zu: Es zeigt sich die Induzierbarkeit eines Natriumflusses durch den Substratfluß, die durch das stereospezifische Transportsystem vermittelt wird; hierbei findet keine Bindung des Natriums^{+} an das Substrat statt. Die Frage der initialen Natriumaufnahme vor dem 15 sec-Meßwert wird noch in Abschnitt 7 d erörtert.

c) Phosphat-Transportsystem

Für anorganisches Phosphat existiert zwar mit dem Arsenat ein Hemmstoff der Rückresorption im proximalen Tubulus, jedoch wird hier, wie bereits erwähnt, das Transportsystem nicht blockiert, sondern Arsenat wird selbst auch transportiert. Somit kann für das Phosphatsystem keine Bestimmung des Natriumflusses bei nicht arbeitendem System durchgeführt werden; wie beim L-Phenylalanin wurde deshalb die Substrataufnahme in einem natriumfreien Medium herangezogen. Eine weitere Schwierigkeit bei der Untersuchung des Phosphatsystems stellt das Fehlen einer den Stereoisomeren vergleichbaren, dem Phosphat chemisch gleichen, jedoch nicht vom System transportierten Substanz dar.

Aus Abbildung 6 geht hervor, daß bei Zugabe von Phosphat zum Medium eine von der Substratkonzentration abhängige Verschiebung der Natriumionen in die Vesikel stattfindet, innerhalb von zwei Stunden wird wieder der Gleichgewichts-

zustand erreicht. (Der Zwei-Stunden-Wert wurde gewählt, weil das Phosphat im natriumfreien Medium nach einer Stunde noch nicht equilibriert ist; der Natriumgehalt der Vesikel veränderte sich nach einer Stunde nicht mehr. - Die Versuche mit Zugabe von 2 mMol/l Phosphat waren wie bei den Phenylalanin-untersuchungen nicht auswertbar.)

Die Zugabe von 10 mMol/l Mannit statt des Phosphats bewirkte keine Veränderung der intravesikulären Natriumkonzentration.

Auch bei der Untersuchung des Phosphatsystems führt also ein vesikeleinwärts gerichteter Substratgradient zu einer Akkumulation von Natriumionen in den Vesikeln. Der Nachweis, daß diese durch das Transportsystem vermittelt wird, läßt sich jedoch aufgrund des Fehlens von nicht transportierten Inhibitoren sowie von nicht transportierten Stereoisomeren nicht mit Sicherheit führen. Einen Natriumeinstrom durch einen osmotischen Effekt bei der Substrataufnahme kann man unter den gewählten Bedingungen aufgrund der Ergebnisse mit D-Glukose und L-Phenylalanin ausschließen. Nicht sicher auszuschließen ist dagegen eine durch die Phosphataufnahme, jedoch nicht über das Kotransportsystem vermittelte Natriumbewegung.

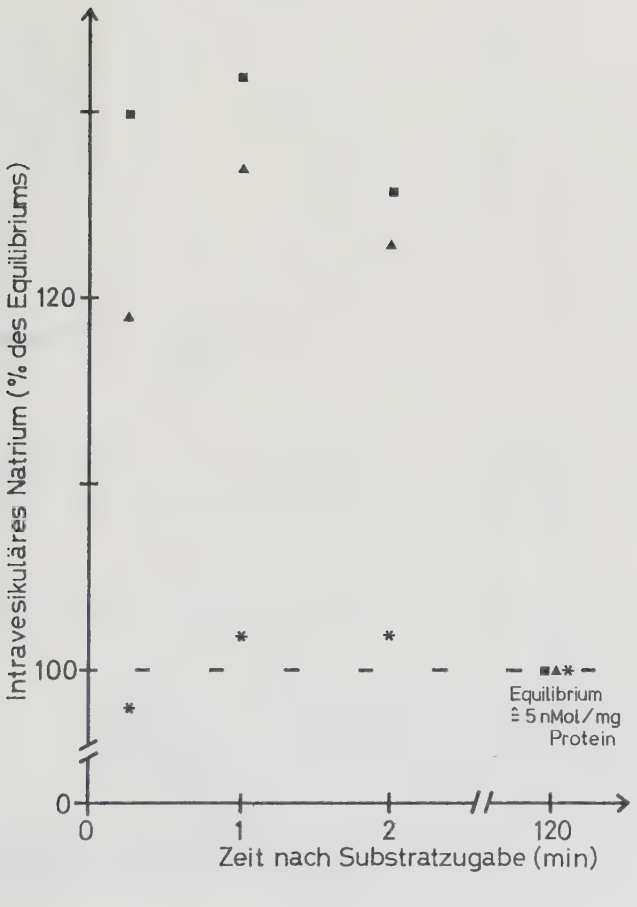
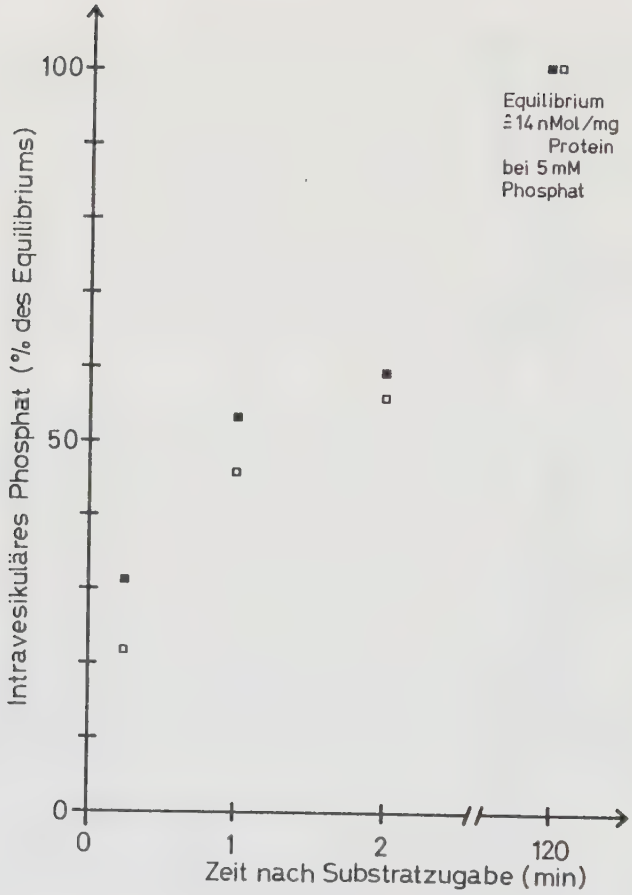


Abb. 6: Einfluß eines Phosphatgradienten auf die Natriumverteilung

Die Vesikel wurden jeweils 1 h bei 25 °C in folgenden Medien vorinkubiert:
100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 0,1 mg Valinomycin und 0,1 mg CFCCP pro mg Protein (in Äthanol, 1 µl pro 100 µl Medium); und bei ▲, ■, ✱ 95 mM KSCN, 5 mM NaSCN, bei □ 100 mM KSCN.

Abb. 6 a zeigt die Veränderungen des Natriumgehalts der Vesikel.



Beim Zeitpunkt O' Zugabe von KH_2PO_4 auf eine Endkonzentration von 5 mMol/l (▲), bzw. 10 mMol/l (■ , □). Bei ✱ Ersatz des KH_2PO_4 durch Mannit. Abb. 6 b zeigt die gleichzeitig gemessene Substrataufnahme (jeweils in Prozent des Wertes nach 2 Stunden).

d) Bestimmung von Kopplungskoeffizienten bei den untersuchten Systemen

Der Kopplungskoeffizient ist im folgenden definiert als das Verhältnis von in die Vesikel aus dem Gleichgewicht aufgenommenen Natriumionen zu durch das Transportsystem aufgenommenem Substrat. Als vom System vermittelte Substrataufnahme gilt im Falle der D-Glukose der phlorrhidzinhemmbare Anteil, im Falle der beiden anderen Transportsysteme die natriumabhängige Aufnahme (Differenz von Aufnahme im natriumhaltigen Medium und Aufnahme im natriumfreien Medium).

Tabelle 6 zeigt die auf diese Weise ermittelten Koeffizienten für die drei Systeme und die verschiedenen Substratkonzentrationen und im Vergleich einen in Untersuchungen der Transportkinetik indirekt bestimmten Wert.

Tabelle 6: Vergleich der direkt bestimmten mit indirekt ermittelten Kopplungskoeffizienten

Bei der direkten Bestimmung ist jeweils das Verhältnis von Natriumaufnahme aus dem Gleichgewicht zu phlorrhidzinhemmbarer (D-Glukose) bzw. natriumabhängiger (L-Phenylalanin, Phosphat) Substrataufnahme und die Standardabweichung angegeben. Verwendet wurden die in Abb. 4 - 6 dargestellten Ergebnisse als absolute Werte (nmol/mg Protein).

Natrium-Kotransportsystem für	Direkte Bestimmung Substratkonzentration 2-5 mMol/l	10 mMol/l	Kinetik
D-Glukose	1,26 ± 0,37 n = 11	0,57 ± 0,24 n = 7	1
L-Phenylalanin	0,76 ± 0,11 n = 5	0,54 ± 0,25 n = 5	>1
Anorganisches Phosphat	(1)	0,95 ± 0,48 n = 4	2

Für das D-Glukosetransportsystem sprechen Untersuchungen der Transportkinetik an Bürstensaummembranvesikeln (12) in Übereinstimmung mit elektrophysiologischen Studien am proximalen Tubulus der Rattenniere (6) für ein Verhältnis von D-Glukose- zu Natriumaufnahme von 1 : 1. Unsere Werte für Substratkonzentrationen von 2 und 5 mMol/l weichen davon nicht signifikant ab. Einen niedrigeren Koeffizienten ergeben allerdings die Untersuchungen mit einer höheren Konzentration (10 mMol/l). Dies läßt sich erklären durch einen bereits während der ersten 15 sec einsetzenden, durch den sich aufbauenden größeren nach außen gerichteten Natriumgradienten erzeugten Natriumrückstrom.

Beim L-Phenylalanin-Transportsystem deuten kinetische Untersuchungen an Membranvesikeln (13) auf einen Koeffizienten von 2 hin, während elektrophysiologische Mikroperfusionsstudien (6) eher für ein Verhältnis von 1 : 1 sprechen. Unsere Ergebnisse scheinen auf einen Koeffizienten von 1 hinzuweisen. Der schon erwähnte Kurvenverlauf der intravesikulären Natriumkonzentration läßt hier aber nicht sicher ausschließen, daß vor dem 15 sec-Meßwert schon höhere Werte erreicht werden, die dann einen Koeffizienten von > 1 ergeben würden. Hierüber könnten Messungen zu früheren Zeitpunkten Aufschluß geben, die aber mit unserer Methode nicht durchführbar waren.

Für das Phosphat-Transportsystem ergab sich bei unseren Versuchen keine Übereinstimmung mit einem an Membranvesikeln kinetisch bestimmten Kopplungskoeffizienten von 2. Dies führte zu folgenden Überlegungen: Die Untersuchungen, die diesen Koeffizienten ergaben (14), deuten darauf hin, daß bei einem pH von 7,4 überwiegend zweiwertiges Phosphat jeweils mit zwei Natriumionen elektroneutral transportiert wird. Diese Versuche wurden bei einer Natriumkonzentration von 100 mMol/l durchgeführt, und es ist möglich, daß bei

unseren Bedingungen (Natriumkonzentration 5 mMol/l) nur eine Natriumbindungsstelle des hypothetischen Carriers, diejenige mit der höheren Affinität, besetzt wird. Dann müßte mit der Phosphataufnahme die Verschiebung negativer Ladung verbunden sein. Um dies zu prüfen, untersuchten wir die Abhängigkeit der Phosphataufnahme von elektrischen Potentialdifferenzen über der Vesikelmembran bei Natriumkonzentrationen von 100 mMol/l und 5 mMol/l. Abbildung 7 zeigt, daß die Erzeugung einer Negativität des Vesikelinneren (Zugabe von Valinomycin bei vesikelauswärts gerichtetem Kalumgradient) unter 100 mMol/l Natriumionen wie erwartet keine Wirkung hat, während im Medium mit einer Konzentration von 5 mMol/l Natriumionen eine Hemmung der Phosphataufnahme eintritt. Dieses Ergebnis läßt die aufgezeigte Interpretation der unterschiedlichen Kopplungskoeffizienten zu; eine abschließende Beurteilung bedarf hier aber sicher weiterer Untersuchungen.

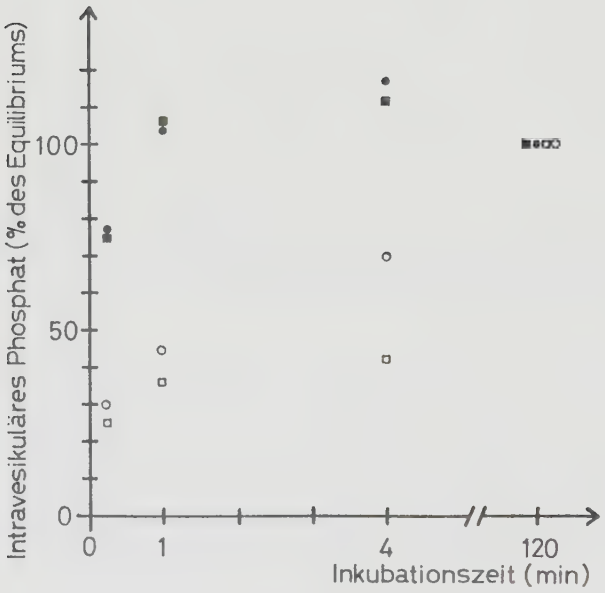


Abb. 7: Effekt eines vesikelauswärts gerichteten Valinomycin-induzierten Kaliumdiffusionspotentials auf die Phosphataufnahme bei verschiedenen Natriumkonzentrationen

Die Vesikel wurden in 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 50 mM Kaliumcyclamat und 5 mM Natriumcyclamat (□,○) bzw. 100 mM Natriumcyclamat (■,●) aufgenommen. Die Medien enthielten 100 mM Mannit, 20 mM Tris-HEPES pH 7,4, 8 mM Kaliumcyclamat (durch Zugabe der Membransuspension), 1 mM KH_2PO_4 und 5 mM Natriumcyclamat (□, ○) bzw. 100 mM Natriumcyclamat (■,●). Bei □, ■ enthielten die Medien Valinomycin (0,1 mg pro mg Protein in Äthanol, 1 µl pro 100 µl Medium), bei ○, ● Äthanol ohne Valinomycin.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kopplung zwischen Natrium- und Substrattransport im proximalen Tubulus der Rattenniere mit Hilfe von isolierten Bürstensaummembranvesikeln aus diesem Tubulusabschnitt untersucht. Grundlage der experimentellen Arbeit mit solchen Vesikeln ist die Vorstellung, einzelne Zellkomponenten unter kontrollierbaren Bedingungen getrennt zu untersuchen und die so gewonnen Ergebnisse dann zu einem Bild von der Gesamtfunktion der Zelle zusammenzusetzen. Bei der Betrachtung von Epithelien liegen Vorteile der Untersuchung von isolierten Vesikeln zum einen in der Trennung der Plasmamembranen von zytoplasmatischen Komponenten, insbesondere von den Strukturen des Zellmetabolismus; dies ermöglicht im Rahmen der Untersuchung von membrangebundenen Transportsystemen die Unterscheidung von direkt Energie verbrauchenden (Transport-ATPasen) und indirekt über Flußkopplungsmechanismen angetriebenen Systemen. Zum anderen können über die Änderung der vom Untersucher wählbaren Zusammensetzung der Pufferlösungen innerhalb und außerhalb der Vesikel extra- und intrazelluläre Faktoren beim Transportvorgang unterschieden und dem Transport zugrunde liegende Triebkräfte untersucht werden. Weiterhin ist eine getrennte Betrachtung von luminaler und kontraluminaler Membran und deren unterschiedlichem Beitrag zum transepithelialen Transport möglich.

Daß die durch Vesikeluntersuchungen gewonnenen Ergebnisse tatsächlich für die Betrachtung der Funktion eines intakten Epithels relevant sind, zeigt der Vergleich von Vesikelstudien mit Untersuchungen an Gewebsverbänden: so korreliert zum Beispiel das unterschiedliche Resorptionsverhalten bestimmter Darmsegmente mit den Aufnahmeraten von

Vesikeln aus den jeweiligen Abschnitten; weiterhin laufen die Veränderungen der renalen Rückresorption von anorganischem Phosphat durch verschiedene Faktoren in vivo parallel zu Änderungen der Phosphataufnahme in Bürstensaumvesikel aus dem proximalen Tubulus (8). Generell ist zum Vergleich zwischen den mit den verschiedenen Ansätzen gewonnen Ergebnissen zu sagen, daß die festgestellte Korrelation stets nur qualitativ sein kann, quantitative Vergleiche sind aufgrund der in beiden Ansätzen existierenden unbekannten Einflüsse auf die Transportraten nicht möglich. So ist zum Beispiel bei der Betrachtung der Transportvorgänge in Darm und Nierentubulus die reabsorbierende Oberfläche bei den intakten Epithelien schwer zu bestimmen und in Vesikelpräparationen ganz unbekannt.

Die Untersuchung der L-Glutaminsäureaufnahme in Bürstensaumvesikel aus dem proximalen Tubulus im ersten Teil der Arbeit bestätigt, daß hier auch für diese Aminosäure ein $Natrium^+$-Substrat-Kotransportsystem existiert. Die Anwesenheit von Na^+ in ausgeglichener Konzentration auf beiden Seiten der Membran stimuliert die L-Glutaminsäureaufnahme, ein vesikeleinwärts gerichteter Natriumgradient führt sogar zu einer vorübergehenden Akkumulation des Substrates in den Vesikeln. Letzteres zeigt, daß die Stimulation der Substrataufnahme in Anwesenheit von $Natrium^+$ nicht nur auf einer Wirkung der Natriumionen auf den Carrier (Beeinflussung der kinetischen Parameter, Cofaktor-Wirkung) beruht, sondern daß die in einem Natriumgradienten vorliegende Energie zur Substrataufnahme gegen ein Konzentrationsgefälle genutzt wird. Diese Nutzung des Natriumgradienten kann nicht nur über eine - bei Postulierung eines $Natrium^+$-Kotransportsystems geforderte - Flußkopplung von Natriumionen und Substrat erfolgen, denkbar wäre im Falle der L-Glutaminsäure auch eine Stimulierung der Substrataufnahme über einen negativ geladenen Substrat-Carrier-Komplex durch ein im Vesikelinneren positi-

ves Natriumdiffusionspotential. Hiergegen spricht die beschriebene Steigerung der Substrataufnahme durch Natrium$^+$ bei Fehlen eines Natriumgradienten sowie die Wirkung von Gramicidin D. Wenn die Wirkung eines Natriumgradienten durch ein innen positives Diffusionspotential zustande käme, wäre unter Gramicidin D durch dessen ionophore Wirkung für Na^+ eine weitere Steigerung der Substrataufnahme zu erwarten. Dies ist nicht der Fall, im Gegenteil wird die Natriumwirkung auf die Stimulation unter Gleichgewichtsbedingungen reduziert; die Energie des Natriumgradienten kann aufgrund des Natriumeinstroms über die Gramicidin D-Kanäle nicht mehr vom Transportsystem genutzt werden. Weiterhin denkbar wäre auch eine Stimulation der L-Glutaminsäureaufnahme durch einen Natriumgradienten über eine - durch das in der Bürstensaummembran lokalisierte Na^+/H^+-Austauschsystem (20) vermittelte - pH-Verschiebung: der durch den Natrium$^+$-Einstrom bewirkte Austritt von Protonen aus den Vesikeln würde zur Steigerung der Aufnahme einer schwachen Säure führen. Die hierbei nötige pH-Verschiebung sollte jedoch durch die verwendete hohe Pufferkonzentration innerhalb und außerhalb der Vesikel vermieden werden.

Ein weiterer Beweis für die Annahme einer Flußkopplung zwischen Natriumionen und Substratmolekülen als Grundlage der Wirkung eines Natriumgradienten ist die in Kapitel 6 beschriebene substratinduzierte Natriumionen-Bewegung: Ein vesikeleinwärts gerichteter L-Glutaminsäuregradient bewirkt eine Verschiebung von Natriumionen aus dem Gleichgewicht in die Vesikel. Durch die Anwesenheit von Kaliumionen und Valinomycin auf beiden Seiten der Membran wird ausgeschlossen, daß diese Natriumbewegung durch eine innen negative Potentialdifferenz verursacht wird, wie sie bei der Aufnahme der negativ geladenen L-Glutaminsäure entstehen könnte. Eine solche Potentialdifferenz würde aufgrund der ionophoren Wirkung des Valinomycins sofort durch einen ent-

sprechenden Fluß von Kaliumionen ausgeglichen (18).

Die dargestellte Wirkung der Natriumionen auf den L-Glutaminsäuretransport erweist sich aufgrund der beschriebenen Versuche als relativ spezifisch: Zugabe von anderen einwertigen Kationen ($Kalium^+$, $Cholin^+$) hat keinen stimulierenden Effekt gegenüber einem Medium, in dem die Salze durch Mannit ersetzt sind. Nur bei Zusatz von $Lithium^+$ zeigt sich eine Steigerung der Aufnahme um etwa 20 %, ein Befund, der den Ergebnissen von Untersuchungen am intakten Tubulus (3) und von Vesikelstudien zum L-Phenylalanintransport (13) entspricht.

Für die Postulierung eines aktiven, carriervermittelten Prozesses bei der Aufnahme der L-Glutaminsäure in die Bürstensaumvesikel spricht weiterhin die ermittelte Sättigung des natriumabhängigen Anteiles der L-Glutaminsäureaufnahme bei steigender Substratkonzentration im Gegensatz zur nicht sättigbaren - weitaus geringeren - natriumunabhängigen Aufnahme. Ferner erweist sich die Glutaminsäureaufnahme in den beschriebenen Versuchen als stereospezifisch. Da Zugabe von D-Glutaminsäure in 10fach höherer Konzentration die Aufnahme von L-Glutaminsäure nicht hemmt, scheint sie nicht über das spezifische Transportsystem aufgenommen zu werden. Eine in anderen Untersuchungen des Aminosäuretransportes gefundene Aufnahme der D-Enantiomorphen über dieselben Systeme mit einer niedrigeren Transportrate (6) läßt sich jedoch nicht ausschließen, da eine direkte Messung der D-Glutaminsäureaufnahme durch radioaktive Markierung derselben nicht durchgeführt wurde. Eine eventuelle geringe Hemmung der Aufnahme der L-Form durch die D-Isomere könnte dann durch die, auch bei Zugabe anderer Aminosäuren beobachtete, Steigerung der L-Glutaminsäureaufnahme durch eine Vesikelschwellung infolge des raschen Aminosäureneinstroms bei der gewählten hohen Konzentration überdeckt werden.

Neuere Untersuchungen an Bürstensaummembranvesikeln aus Kaninchennieren schließen diese Möglichkeit aus (es sei denn, es bestünde hier ein Speziesunterschied), da hier auch bei zusätzlich zu den Hemmungsversuchen durchgeführten Austauschdiffusionsexperimenten D-Glutaminsäure keine Wirkung auf das L-Glutaminsäuresystem hat (21). Der in Kapitel 4 beschriebene Versuch zeigt außerdem eine strenge Substratspezifität des untersuchten Systems; neben L-Glutaminsäure wird nur L-Asparaginsäure transportiert und kann somit als einzige Aminosäure die Aufnahme der L-Glutaminsäure hemmen. Diese Spezifität für saure Aminosäuren paßt zu den bereits in der Einleitung erwähnten Ergebnissen von Mikroperfusionsuntersuchungen, nach denen im proximalen Tubulus neben anderen ein System für saure Aminosäuren existiert (6). Die oben bereits erwähnten Untersuchungen an Kaninchennieren (21) zeigen, daß auch die hier nicht untersuchten Aminosäuren L-Cysteinsäure und - erstaunlicherweise - D-Asparaginsäure vom gleichen System transportiert werden.

Die Versuche zur Membranbindung der L-Glutaminsäure weisen darauf hin, daß etwa 70 % des gemessenen Substratgehaltes der Vesikel auf tatsächlicher Aufnahme in einen osmotisch reaktiven Raum beruhen. Der Mechanismus der beobachteten Membranbindung, zum Beispiel ob es sich hierbei um eine Lösung in der Lipidphase der Membran oder um eine Bindung an positive Valenzen handelt, ob die Bindung innerhalb oder außerhalb der Vesikel stattfindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Hierzu müßten wegen der in unserer Methode enthaltenen Fehlerquellen - Extrapolation über einen großen Bereich - zunächst noch andere Versuche zur Bestimmung der Bindung, zum Beispiel Hitzedenaturierung der Vesikel, durchgeführt werden. Dies erschien uns aus den bereits im Ergebnisteil dargelegten Gründen nicht nötig.

Die in Kapitel 5 dargestellten Ergebnisse der Versuche zur Potentialabhängigkeit werfen einige Fragen auf, die im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnten. Geht man von einer Aufnahme der L-Glutaminsäure über ein $Natrium^+$-Substrat-Kotransportsystem aus, so könnte diese Aufnahme entweder elektroneutral in Form eines ungeladenen $Natrium^+$-$Substrat^-$-Carrier-Komplexes oder elektrogen durch Kopplung an zwei Natriumionen geschehen. Die aus histochemischen Untersuchungen der Nierenrinde (23) bekannte hohe intrazelluläre Konzentration der sauren Aminosäuren (etwa 80fache Anreicherung gegenüber dem Plasma) verlangt hierbei eine Kopplung nicht nur an den $Natrium^+$-Konzentrationsgradienten, sondern auch an die elektrochemische Potentialdifferenz, also einen elektrogenen Transport der sauren Aminosäuren. Tatsächlich fand sich bei elektrophysiologischen Messungen am proximalen Tubulus eine Ladungsverschiebung in Form einer Zelldepolarisation bei luminaler Applikation von L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure in Anwesenheit von Natriumionen (22). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen hierzu im Widerspruch zu stehen: Ein Anionenaustausch zeigt weder bei Positivierung noch bei Negativierung des Vesikelinneren eine Beeinflussung der L-Glutaminsäureaufnahme, ebenso ist ein vesikeleinwärts gerichtetes valinomycininduziertes Kaliumdiffusionspotential ohne Wirkung. Lediglich bei Vorbeladung der Vesikel mit Kaliumionen führt der Zusatz von Valinomycin und die damit verbundene negative Ladung der Innenseite zu einer Stimulierung der Substrataufnahme, die jedoch verglichen mit der Steigerung der D-Glukoseaufnahme unter diesen Bedingungen nur sehr gering ist. Hinweise auf eine Elektrogenität des L-Glutaminsäuretransportes liegen also nur bei Kaliumbeladung der Vesikel vor, während in kaliumfreien Vesikeln die Aufnahme elektroneutral zu erfolgen scheint. Hierzu ist zu bemerken, daß die oben erwähnten elektrophysiologischen Untersuchungen an intakten Zellen in vivo und somit natürlich in An-

wesenheit von Kalium$^+$ auf der Innenseite der Membran durchgeführt wurden.

Bei der Vorbeladung der Vesikel mit Kaliumionen fällt weitaus mehr als der Valinomycin-Effekt eine Steigerung der L-Glutaminsäuretransportrate gegenüber kaliumfreien Vesikeln auf. Dies läßt vermuten, daß das Transportsystem für saure Aminosäuren nicht nur durch die Anwesenheit von Natriumionen und durch einen einwärts gerichteten Natriumgradienten stimuliert wird, sondern daß auch Kaliumionen eine Steigerung der Substrataufnahme bewirken; hierbei ist aufgrund der durchgeführten Versuche nicht zu unterscheiden, ob die alleinige Anwesenheit von Kalium$^+$ an der Innenseite der Membran oder der auswärts gerichtete Kaliumgradient wirksam sind. Weiterhin ist anzunehmen, daß erst die Beladung der Vesikel mit Kaliumionen den L-Glutaminsäuretransport elektrogen macht. Um dies zu verifizieren, erscheint der durchgeführte Valinomycinversuch jedoch nicht geeignet, da die Zugabe von Valinomycin den Kaliumgradienten reduziert und damit eine mögliche Triebkraft der Substrataufnahme verändert. Hieraus könnte eine dem valinomycininduzierten Kaliumdiffusionspotential entgegengerichtete Beeinflussung der L-Glutaminsäureaufnahme resultieren, die die nur geringe Valinomycinwirkung erklären könnte. Mittlerweile haben weitergehende Untersuchungen des L-Glutaminsäuretransportes durch Burckhardt et al. (24) die hier aufgeworfenen Fragen nahezu vollständig klären können. Es zeigte sich, daß der stimulierende Effekt einer Vorbeladung der Vesikel mit Kaliumionen in Anwesenheit eines Natriumgradienten auch bei innen und außen ausgeglichener Kaliumkonzentration auftritt. Er beruht also nicht auf der Wirkung eines Kaliumdiffusionspotentials, sondern auf direkter Beeinflussung der Eigenschaften des Transportsystems. Hinzu kommt, daß ein auswärts gerichteter Kaliumgradient als zusätzliche Triebkraft genutzt wird. Ein direkter Nach-

weis eines Kaliumausstroms während der L-Glutaminsäureaufnahme war nicht möglich; dennoch spricht die beobachtete Steigerung der Substrataufnahme durch einen auswärts gerichteten Kaliumgradienten in Abwesenheit eines Natriumgradienten sowie die Hemmung durch einen vesikeleinwärts gerichteten Kaliumgradienten für eine Stimulation über einen mit der Substrataufnahme gekoppelten Kaliumefflux. Bei den beschriebenen Kalium$^+$-Effekten war Kalium$^+$ durch Rubidium$^+$ganz, durch Cäsium$^+$ teilweise ersetzbar, andere Kationen hatten keine Wirkung. Weiterhin wurde in der genannten Untersuchung eindeutig die Potentialsensibilität der L-Glutaminsäureaufnahme nach Beladung der Vesikel mit Kaliumionen nachgewiesen, während in kaliumfreien Vesikeln die fehlende Potentialabhängigkeit bestätigt wurde. Hierbei fanden sich übereinstimmende Ergebnisse bei Versuchen mit einem innen negativen H^+-Diffusionspotential, bei Anionenaustausch-Experimenten sowie bei Untersuchungen mit einem potentialsensitiven Farbstoff; der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Versuch mit einem auswärts gerichteten valinomycininduzierten Kaliumdiffusionspotential zeigte sich hingegen auch bei Burckhardt et al. als ungeeignet zum Nachweis der Potentialsensibilität: nach Zusatz von Valinomycin fand sich nur die initiale Aufnahme (20 sec-Wert) gering erhöht, nach 60 sec zeigte sich eine niedrigere Aufnahme als im Vergleichsmedium ohne Valinomycin. Hier scheint tatsächlich die durch Valinomycin vermittelte Reduzierung des Kaliumgradienten - und damit einer der Triebkräfte des L-Glutaminsäuretransportes - der Stimulierung durch Negativierung der Innenseite entgegenzuwirken.

Burckhardt et al. schließen aus ihren Ergebnissen, daß in Anwesenheit eines einwärts gerichteten Na^+-Gradienten und eines auswärts gerichteten K^+-Gradienten, also unter Bedingungen, die den physiologischen Verhältnissen im proximalen Tubulus entsprechen, die L-Glutaminsäureaufnahme

als Symport eines Substratmoleküls mit drei Natriumionen und als Antiport mit einem Kaliumion geschieht. Dies kann dann auch das Zustandekommen der bereits erwähnten sehr hohen intrazellulären L-Glutaminsäurekonzentration erklären. Ist die Vesikelinnenseite frei von Kaliumionen, findet ein Symport von einem L-Glutaminsäuremolekül und einem Natriumion statt. Hierdurch wird die in dieser Arbeit beschriebene fehlende Potentialabhängigkeit der L-Glutaminsäureaufnahme erklärt.

Die oben bereits mehrfach zitierten Untersuchungen der L-Glutaminsäureaufnahme in Bürstensaumvesikel aus Kaninchennieren von Schneider et al. (21) bestätigen die in der vorliegenden Arbeit gemachten Angaben über das L-Glutaminsäure-Transportsystem. Bezüglich der Transportstimulation durch Natriumionen, der Wirkung eines einwärts gerichteten Natriumgradienten und der Zugabe von Gramicidin D sowie der Kationenspezifität des Systems, ferner bezüglich der Substratsättigung in Anwesenheit und Abwesenheit von $Natrium^{+}$ kommen die Autoren zu vergleichbaren Ergebnissen. Diese Arbeit beschäftigt sich auch eingehend mit dem Problem der Potentialsensibilität des L-Glutaminsäuretransportes. Aus Versuchen mit Kalium- und Protonendiffusionspotentialen, mit unterschiedlich permeablen Anionen sowie mit einem potentialsensitiven Farbstoff schließen die Untersucher hierbei auf die Elektroneutralität der L-Glutaminsäureaufnahme. Die Untersuchungen wurden jedoch, wie auch in der vorliegenden Arbeit, bis auf einen Versuch zum vesikelauswärts gerichteten Kaliumdiffusionspotential mit kaliumfreien Vesikeln durchgeführt. Und nach der Errichtung eines auswärts gerichteten Kaliumgradienten führt die Zugabe von Valinomycin zum von Burckhardt et al. (24) beschriebenen Effekt: geringe Stimulation der L-Glutaminsäureaufnahme nach 15 Sekunden, danach Hemmung gegenüber einem valinomycinfreien Medium. Die Untersuchungen von

Schneider et al. bestätigen soweit also die auch in der vorliegenden Arbeit gezeigte Elektroneutralität des L-Glutaminsäuretransportes in Abwesenheit von Kalium$^+$ auf der Innenseite der Vesikel und weisen auch auf die besondere Wirkung der Beladung der Vesikel mit Kalium$^+$ auf den Transport hin. Dieser Kaliumeffekt ist Gegenstand einer weiteren Untersuchung von Schneider und Sacktor (25). Bezüglich der Wirkung einer Beladung der Vesikel mit Kalium$^+$ auf das L-Glutaminsäure-Transportsystem kommen die Autoren zu den gleichen Ergebnissen, die oben nach der Arbeit von Burckhardt et al. (24) dargestellt wurden, mit der Ausnahme, daß auch in der Anwesenheit von Kaliumionen auf der Vesikelinnenseite ein elektroneutraler L-Glutaminsäuretransport postuliert wird, und zwar als Symport eines Substratmoleküls mit zwei Natriumionen (bzw. einem Natrium$^+$ und einem Proton) unter Antiport eines Kaliumions. Zum Beweis hierfür werden der fehlende Valinomycin-Effekt in Anwesenheit eines auswärts gerichteten Kaliumgradienten sowie ein nur sehr geringer Effekt eines einwärts gerichteten Thiocyanatgradienten angeführt. Die Untersucher setzen sich hiermit in Widerspruch zu bereits oben erwähnten elektrophysiologischen Messungen am intakten proximalen Tubulus (22), die in Anwesenheit von Natrium$^+$ in der Tubulusflüssigkeit (und natürlich Kalium$^+$ innerhalb der intakten Zellen) eine Depolarisation der Membran nach Applikation von L-Glutaminsäure feststellten. Diese Diskrepanz könnte eventuell durch einen Speziesunterschied erklärt werden, da sowohl die elektrophysiologischen Untersuchungen als auch die Vesikelstudien von Burckhardt et al. Rattennieren verwendeten, während Schneider et al. Kaninchennieren präparierten. Um einen solchen Unterschied postulieren zu können und um die Frage der Ladungsverschiebung beim L-Glutaminsäuretransport weiter zu klären, sollten jedoch zunächst die doch sehr aussagekräftigen Versuche mit Protonendiffusionspotentialen und mit einem potentialsensitiven Farbstoff

in Anwesenheit von Kalium$^+$ im Vesikelinneren, die bei Burckhardt et al. ganz eindeutige Ergebnisse brachten, auch mit Membranvesikeln aus Kaninchennieren durchgeführt werden; zumal der von Schneider und Sacktor angeführte Versuch mit einem auswärts gerichteten Kaliumgradienten sich sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in derjenigen von Burckhardt et al. als zum Nachweis einer Potentialabhängigkeit untauglich erwiesen hat.

Weiterhin wäre unter der von Schneider und Sacktor gemachten Annahme eines elektroneutralen L-Glutaminsäuretransportes ungeklärt, wie es zu der beobachteten hohen Anreicherung der L-Glutaminsäure in den Zellen des proximalen Tubulus kommen kann. Eine möglich Erklärung hierfür bieten Sacktor et al. in einer weiteren neueren Arbeit (26). Bereits in der Einleitung wurde erwähnt, daß nach elektrophysiologischen Untersuchungen für die sauren Aminosäuren auch basal-lateral ein natriumabhängiges, potentialsensitives spezifisches Transportsystem zu existieren scheint (6, 22). Dieses System wurde nun von Sacktor et al. an mit einer Percoll-Gradienten-Methode isolierten Vesikeln aus basal-lateraler Membran näher untersucht. Es zeigte sich, daß hier tatsächlich ein System existiert, das natriumabhängig L-Glutaminsäure transportiert und die Energie eines vesikeleinwärts gerichteten Natriumgradienten zur Substratakkumulation nutzt. Ferner führt, wie auch in den Bürstensaumvesikeln, ein auswärts gerichteter Kaliumgradient - in Anwesenheit von Natrium$^+$ - zur Akkumulation von L-Glutaminsäure. Auch hier postulieren Sacktor et al. die Elektroneutralität des Transports - unter Hinweis auf den fehlenden Valinomycin-Effekt in einem Versuch mit einem auswärts gerichteten Kaliumgradienten - und gehen weiterhin davon aus, daß die hohe Anreicherung der L-Glutaminsäure durch die Existenz von durch Natrium- und Kaliumgradienten angetriebenen Transportsystemen auf beiden

Seiten der Tubuluszelle zu erklären ist. Da die Annahme eines elektroneutralen Transportes auch hier im Gegensatz zu den bereits erwähnten elektrophysiologischen Messungen steht und da der zur Bestimmung der Potentialabhängigkeit der L-Glutaminsäureaufnahme von Sacktor et al. durchgeführte Versuch aus den bereits oben dargelegten Gründen nur eine geringe Aussagekraft hat, sollten hier noch weitere Untersuchungen der Elektrogenität mit den von Burckhardt et al. (24) verwendeten Methoden durchgeführt werden. Danach sollte dann zu klären sein, ob die beschriebenen - in Bürstensaum und basal-lateraler Membran lokalisierten - Transportsysteme und die ihnen in vivo zur Verfügung stehenden Triebkräfte die L-Glutaminsäureakkumulation hinreichend erklären können oder ob hier noch weitere, bisher nicht bekannte Faktoren eine Rolle spielen.

Nach der Charakterisierung des L-Glutaminsäure-Transportsystems war das Ziel des zweiten Teils der Arbeit, in diesem System sowie in den bereits bekannten D-Glukose-, L-Phenylalanin- und Phosphat-Transportsystemen die substratinduzierte Natriumbewegung quantitativ zu erfassen und so das Verhältnis von bewegten Natriumionen zu transportierten Substratmolekülen, den Kopplungskoeffizienten, zu bestimmen. Hierbei bestehen folgende Schwierigkeiten: Untersucht man den Natriumstrom unter Natriumgradientenbedingungen, so findet ein hoher Substrateinstrom statt, und dementsprechend ist eine starke gekoppelte Natriumbewegung zu erwarten. Unter Gradientenbedingungen geschieht jedoch auch ohne Zugabe von Substrat ein Natriumeinstrom, der über vom untersuchten Transportsystem unabhängige Kanäle, zum Beispiel das schon erwähnte Na^+/H^+-Austauschsystem (20), stattfindet. Im Verhältnis zu diesem unspezifischen Fluß ist die substratinduzierte Natriumbewegung sehr gering, sie liegt innerhalb der Fehlergrenzen der verwendeten Methode und ist deshalb nicht auswertbar. Also

müssen die Versuche bei innerhalb und außerhalb der Vesikel ausgeglichener Natriumkonzentration durchgeführt werden. Dadurch werden die durch einen Gradienten verursachten unspezifischen Natriumbewegungen verhindert, jedoch ist jetzt auch der Substrateinstrom und damit der substratinduzierte Natriumfluß geringer . Hinzu kommt, daß erst bei niedrigen Natriumkonzentrationen (5 mMol/l) der durch den Substrattransport ausgelöste Natriumeinstrom quantitativ auswertbar wird, da erst dann mit den angewandten Methoden die Veränderung der in den Vesikeln vorliegenden Natriummenge erfaßbar wird. Diese Reduzierung der Natriumkonzentration bewirkt natürlich auch wieder eine Abnahme der natriumabhängigen Substrataufnahme. Diese Schwierigkeiten machten für das L-Glutaminsäuresystem, wie bereits in Kapitel 6 beschrieben, eine quantitative Bestimmung der Natrium-Substrat-Relation unmöglich. Für die anderen untersuchten Systeme fanden sich jedoch nach Ausschluß störender unspezifischer Na^+-Ströme gut reproduzierbare Ergebnisse. Dies wurde erreicht durch lange Vorinkubation der Vesikel im ^{22}Na-haltigen Transportmedium und Zugabe des Substrates zum Start des Transportvorganges ohne Änderung der Natriumkonzentration sowie der Osmolarität des Außenmediums. Hierbei wurde besonders auch auf die spezifische Aktivität des ^{22}Na geachtet. Weiterhin wurde, wie oben bereits erwähnt, durch die Anwesenheit von Kaliumionen auf beiden Seiten der Membran und Zugabe von Valinomycin das Entstehen von elektrischen Potentialdifferenzen verhindert. Auf diese Weise konnten unspezifische Natriumbewegungen bei Substratzugabe vermieden werden, und man kann davon ausgehen, daß die beobachtete Natriumakkumulation durch die Substrataufnahme vermittelt wurde. Daß sie aufgrund eines Carrier-vermittelten Kotransportes zustande kommt, zeigen der im Ergebnisteil näher beschriebene Nigericineffekt sowie die Wirkung von Hemmstoffen und nicht transportierten Stereoisomeren. Da im Falle des

Phosphats weder ein nicht transportierter Hemmstoff noch nicht transportierte Isomere existieren, haben diese Versuche leider nur eine geringere Aussagekraft.

Mit dem beschriebenen Versuchsaufbau konnten für die drei untersuchten Transportsysteme aufgrund der beobachteten Natriumbewegung sowie der gleichzeitig gemessenen Substrataufnahme mit den unten beschriebenen Einschränkungen die gesuchten Kopplungskoeffizienten bestimmt werden. Sie sind in Tabelle 6 zusammengestellt und werden hier mit Werten verglichen, die aus Untersuchungen der Transportkinetik mit Membranvesikeln stammen. Zu diesen Werten ist zu sagen, daß auch die Bestimmung eines Kopplungskoeffizienten auf diesem Wege mit großen Schwierigkeiten und Unsicherheiten behaftet ist, da die hierbei zugrunde gelegte intravesikuläre Natriumkonzentration sowie die transmembranale elektrische Potentialdifferenz aufgrund ihrer zeitabhängigen Veränderung nur schwer zu bestimmen sind.

Bei der Untersuchung des D-Glukose-Transportsystems findet sich für niedrige Substratkonzentrationen (2 und 5 mMol/l) Übereinstimmung des direkt gemessenen mit einem aus der Kinetik bestimmten Kopplungskoeffizienten von 1 (12). Da hier auch, wie in der Einleitung erwähnt, elektrophysiologische Untersuchungen (6) das gleiche Ergebnis brachten, kann man es wohl als gesichert betrachten, daß der Glukosecarrier Natrium$^+$ und Glukose im Verhältnis von 1 : 1 transportiert. Daß unser Kopplungskoeffizient für höhere Substratkonzentrationen (10 mMol/l) signifikant niedriger als 1 ist, kann, wie im Ergebnisteil bereits angesprochen, durch einen bis zum 15-sec-Meßzeitpunkt bereits abgelaufenen Na^+-Efflux bedingt sein. Hierbei könnte sich ein solcher Efflux eventuell erst bei höheren Substratkonzentrationen bemerkbar machen, da sich dann durch einen verstärkten substratinduzierten Natriumeinstrom ein größerer vesi-

kelauswärts gerichteter Natriumgradient als Triebkraft für einen solchen Efflux aufbauen könnte. Zur Abklärung dieses Problems wäre es nötig, Meßwerte für Natrium- und Substrataufnahme zu gewinnen, die näher am Startzeitpunkt des Transportprozesses liegen. Bei solchen früheren Meßzeitpunkten würden dann Werte gemessen, die näher an der tatsächlichen "initialen" Aufnahme liegen, das heißt, die tatsächlichen Transportbedingungen (Zusammensetzung von Innen- und Außenmedium) wären den vom Untersucher vorgegebenen und bei der Auswertung vorausgesetzten noch weitgehend gleich. In diesem Zusammenhang würde das bedeuten, daß der substratinduzierte Natriumeinstrom noch keinen so großen Natriumgradienten aufgebaut hätte, daß dieser den gemessenen Einstrom verfälschen könnte. Eine solche Vorverlegung des ersten Meßzeitpunktes ist mit unserer manuellen Filtrationstechnik nur in geringem Maße möglich. Es existieren jedoch halbautomatische Apparate, die Messungen bereits 1 - 2 sec nach dem Start des Transportvorganges erlauben (27). Mit einem solchen Gerät, das uns leider nicht zur Verfügung stand, wäre sicher eine weitere Klärung der angesprochenen Frage möglich.

Sehr eingehend beschäftigt sich mit der Frage des D-Glukose-abhängigen Natriumtransportes auch eine neuere Arbeit von Hilden und Sacktor (28). Hier wurde, um die oben geschilderten prinzipiellen Schwierigkeiten bei der Messung der Natriumbewegung zu umgehen, die Natriumkonzentration in den Medien noch weiter gesenkt. Die Untersuchungen wurden bei einer Konzentration von 50 μMol/l $Natrium^+$ im Gegensatz zu 5 mMol/l in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Hierdurch wurde die Natriumbewegung wesentlich deutlicher meßbar und damit exakter unter verschiedenen Bedingungen auswertbar; so war nach Zugabe von D-Glukose ein Anstieg des intravesikulären Natriumgehaltes um fast 100 % während der ersten drei Minuten zu verzeich-

nen gegenüber nur bis zu 20 % in der vorliegenden Arbeit. Unter diesen Bedingungen bestätigen Hilden und Sacktor ganz eindeutig, daß ein vesikeleinwärts gerichteter D-Glukose-Gradient über das Natrium-Kotransport-System zur Natriumakkumulation in den Vesikeln führt. Es wird gezeigt, daß auch andere natriumabhängig transportierte Zucker, wie zum Beispiel α-Methyl-D-Glukosid, dies bewirken, während natriumunabhängig aufgenommene Zucker keine Natriumbewegung auslösen. Erwartungsgemäß läßt sich jedoch bei dieser niedrigen Natriumkonzentration keine exakte Auswertung der natriumabhängigen D-Glukoseaufnahme durchführen, so daß die Autoren zur Frage der Stöchiometrie des Kotransportes keine Aussage machen können.

Für das L-Phenylalanin-Transportsystem zeigt Tabelle 6 für die von uns ermittelten Kopplungskoeffizienten in beiden Konzentrationsbereichen Werte, die signifikant niedriger als 1 sind. Hierbei fällt wie beim D-Glukose-System ein Kleinerwerden des Kopplungskoeffizienten bei höherer Substratkonzentration auf, was auf den gleichen Ursachen beruhen könnte und wie oben beschrieben weiter abgeklärt werden müßte. Zudem läßt sich aufgrund des in Kapitel 7 bereits erwähnten besonderen Kurvenverlaufs der Meßwerte für den Na^+-Einstrom für beide Substratkonzentrationen nicht ausschließen, daß bis zum ersten Meßzeitpunkt (15 sec) bereits das Maximum des Natriumgehaltes der Vesikel überschritten ist. Ist dies der Fall, so werden Messungen zu früheren Zeitpunkten, wie sie mit dem oben erwähnten Apparat durchgeführt werden können, deutlich höhere Kopplungskoeffizienten ergeben, zumal dann zusätzlich auch noch die natriumabhängige Substrataufnahme geringer ist. Interessant wäre eine solche weitergehende Untersuchung des L-Phenylalanin-Systems, weil hier Versuche zur Transportkinetik mit Membranvesikeln (13) auf einen Koeffizienten von > 1 hindeuten, während elektrophysiologische Untersuchungen für

einen Koeffizienten von 1 sprechen (6). Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse läßt sich wegen der beschriebenen Unsicherheiten hierzu keine Aussage machen.

Auch zum Transportsystem für anorganisches Phosphat läßt sich bezüglich eines Kopplungskoeffizienten mit den dargestellten Ergebnissen keine sichere Feststellung treffen. Aufgrund des bereits mehrfach erwähnten Fehlens von nicht transportierten Hemmstoffen und Stereoisomeren sind die Untersuchungen des Phosphat-Systems bereits vom Ansatz her mit Unsicherheiten behaftet. Hinzu kommt, daß die Versuche mit niedriger Substratkonzentration (2 und 5 mMol/l) nicht korrekt auswertbar waren, da die natriumabhängige Substrataufnahme in die Nähe der Fehlergrenze unserer Methode sank. Die Ergebnisse deuten hier auf einen Kopplungskoeffizienten von etwa 1 hin. Dies entspricht dem bei höherer Substratkonzentration (10 mMol/l) ermittelten Koeffizienten. Beide Werte stehen jedoch im Widerspruch zu den Befunden von Kinetikstudien an Vesikeln (14) sowie elektrophysiologischen Untersuchungen (5), die für ein Verhältnis von Natriumaufnahme zu Substrataufnahme von 2 sprechen. Neuere Untersuchungen von Burckhardt et al. (29) an Bürstensaummembranvesikeln bestätigen diese Annahme. Sie weisen mittels eines potentialsensitiven Farbstoffes nach, daß bei pH 6,0, wenn hauptsächlich $H_2PO_4^-$ vorliegt, mit der Phosphataufnahme deutlich positive Ladung verschoben wird, während bei pH 8,0, bei überwiegenden Vorhandensein von HPO_4^{--}, dies nur in sehr geringem Maße stattfindet. Die Autoren zeigen ferner, daß die bereits bekannte Steigerung der Phosphataufnahme mit steigendem pH nicht auf einer Bevorzugung des dann vermehrt vorliegenden divalenten Phosphats durch das Transportsystem, sondern auf einer pH-Abhängigkeit des Systems selbst beruht. Die Beeinflussung der Transportrate geschieht hierbei durch eine Erhöhung der Natrium-Affinität des Systems mit steigendem pH des Außen-

mediums. Dies bewirkt, daß bei Erhöhung der Natriumkonzentration der pH-Effekt auf die Aufnahmerate abnimmt. Aus Daten einer früheren Untersuchung des Phosphattransports in Bürstensaumvesikel (14) schließen Burckhardt et al., daß bei unendlicher Natriumkonzentration der pH keinen Effekt mehr hat. Bei ihren Untersuchungen war jedoch noch bis zu einer Natriumkonzentration von 500 mMol/l ein solcher Effekt nachweisbar. Dies läßt vermuten, daß bis zu dieser Konzentration noch keine komplette Sättigung des Systems für Natrium$^+$ erreicht war; mindestens eine der beiden Natriumbindungsstellen hat also nur geringe Affinität. Hierzu paßt ein in einer anderen Arbeit (30) gefundenes scheinbares K_m für Natrium$^+$ von über 100 mMol/l.

In Kapitel 7 d wurde versucht, die Diskrepanz zwischen dem hier gefundenen Kopplungskoeffizienten von 1 und dem aufgrund der vorgenannten Ergebnisse anzunehmenden Koeffizienten von 2 durch die Besetzung nur einer der beiden Natriumbindungsstellen des Transportsystems bei der niedrigen Natriumkonzentration von 5 mMol/l zu erklären. Es zeigte sich dort, daß in Gegenwart von nur 5 mMol/l Natrium$^+$ die Phosphataufnahme im Gegensatz zur Aufnahme in einem Medium, das 100 mMol/l Natrium$^+$ enthielt, durch ein innen negatives Kaliumdiffusionspotential gehemmt wurde, woraus auf die Kopplung von einem Phosphatmolekül mit einem Natriumion (HPO_4^{--} + Na^+) geschlossen werden kann. Um dies als gesichert zu betrachten, müßten jedoch noch eingehendere Untersuchungen der Elektrogenität des Phosphattransportes bei niedrigen Natriumkonzentrationen durchgeführt werden (zum Beispiel Anionenaustausch, einwärts gerichtetes Kaliumdiffusionspotential, Verhalten bei pH 6,0). Die beiden oben genannten Arbeiten (29, 30) haben zumindest gezeigt, daß eine Voraussetzung dieses Erklärungsmodells, nämlich eine nur geringe Affinität einer Natriumbindungsstelle, gegeben ist. Eine weitere Abklärung

dieses Problems war im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich, weshalb hier einige Fragen offen bleiben mußten.

Wenn auch bezüglich des Problems der Kopplung von Natrium- und Substrattransport besonders bei der Untersuchung des L-Phenylalanin- und des Phosphattransportsystems vieles ungeklärt blieb, so ist es doch gelungen, mit der dargestellten Methodik einen substratinduzierten Natriumfluß als wesentliche Vorausstzung für die Postulierung eines $Natrium^+$-Substrat-Kotransportsystems eindeutig nachzuweisen. Ferner ist mit dem geschilderten experimentellen Vorgehen die direkte Bestimmung des Kopplungskoeffizienten für Natrium- und Substrataufnahme prinzipiell möglich. Hier sollten weitere methodische Verbesserungen (frühere Meßzeitpunkte, Verringerung der Fehlerbreite) zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

Zusammenfassung

An Bürstensaummembranvesikeln aus dem proximalen Tubulus der Rattenniere, die durch eine Ca^{++}-Präzipitationsmethode gewonnen wurden, wurde mittels radioaktiver Markierung von Substrat und Natriumionen mit Hilfe einer Filtrationsmethode und eines Liquid-Scintillation-Counters die Existenz eines spezifischen Transportsystems für die saure Aminosäure L-Glutaminsäure nachgewiesen. Dieses System transportiert L-Glutaminsäure natriumabhängig in die Vesikel, wobei die Energie eines einwärts gerichteten Natriumgradienten zur Substratakkumulation genutzt wird. $Natrium^{+}$ ist hierbei durch andere einwertige Kationen nicht zu ersetzen, nur $Lithium^{+}$ zeigt eine geringe Stimulierung der Substrataufnahme. Die natriumabhängige L-Glutaminsäureaufnahme zeigt Sättigung bei steigender Substratkonzentration, Stereospezifität für die L-Form sowie Spezifität für die sauren Aminosäuren.

Bei der L-Glutaminsäureaufnahme in die Vesikel, die im Inneren frei von Kaliumionen sind, scheint keine Ladung verschoben zu werden, was für den Symport je eines Substratmoleküls und eines Natriumions spricht. Ist auf der Vesikelinnenseite $Kalium^{+}$ vorhanden, wird bei Substrataufnahme Ladung verschoben. Ferner führt die Kaliumbeladung der Vesikel zu einer Stimulation der L-Glutaminsäureaufnahme. Aufgrund der weiterführenden Arbeit von Burckhardt et al. (24) ist dies als direkter Effekt der Kaliumionen auf das Transportsystem zu deuten, wobei ein auswärts gerichteter Kaliumgradient auch zur Substratakkumulation genutzt wird. Es findet jetzt ein Symport eines Substratmoleküls mit drei Natriumionen unter Antiport eines Kaliumions statt; dies kann auch das Zustandekommen der bekannten hohen L-Glutaminsäurekonzentration in den Zellen des proximalen Tubulus erklären.

Ferner wurde für das L-Glutaminsäuresystem der direkte Nachweis der Kopplung von Substrat- und Natriumaufnahme über die Induzierbarkeit eines Natriumeinstromes in Anwesenheit eines einwärts gerichteten L-Glutaminsäuregradienten geliefert. Aussagen über die Stöchiometrie dieser Kopplung konnten aufgrund experimenteller Schwierigkeiten nicht gemacht werden.

Dies gelang jedoch zumindest ansatzweise bei Untersuchung der schon bekannten Systeme für D-Glukose, L-Phenylalanin und anorganisches Phosphat. Für die Aufnahme der D-Glukose wurde der aus anderen Untersuchungen vermutete Kopplungskoeffizient von 1 (Kopplung je eines Glukosemoleküls mit einem Natriumion) bestätigt. Diskrepanzen zwischen den für das L-Phenylalanin- und das Phosphatsystem gefundenen Koeffizienten und anderweitig ermittelten, sich auch zum Teil widersprechenden Werten ließen sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Verbesserungen der dargestellten Methodik, die grundsätzlich zur Bestimmung der Kopplungskoeffizienten als geeignet erscheint, könnten hier weitere Klarheit verschaffen.

Abkürzungen

HEPES: N-2-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure

Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

CFCCP: Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon

ATP: Adenosintriphosphorsäure

Literatur

1. Crane, R. K.: Hypotheses for mechanism of intestinal active transport of sugars; Fed. Proc. 21, 891 - 895, 1962
2. Crane, R. K.: Na^+-dependent transport in the intestine and other animal tissues; Fed. Proc. 24, 1000 - 1005, 1965
3. Ullrich, K. J.: Sugar, amino acid and Na^+ cotransport in the proximal tubule; Ann. Rev. Physiol. 41, 181 - 195, 1979
4. Baumann, K., de Rouffignac, C., Roinel, N., Rumrich, G., Ullrich, K. J.: Renal phosphate transport: Inhomogenity of local proximal transport rates and sodium dependence; Pfluegers Arch. 356, 287 - 297, 1975
5. Frömter, E.: Solute transport across epithelia: What can we learn from micropuncture studies on kidney tubules?; J. Physiol. 288, 1 - 31, 1979
6. Ullrich, K. J.: Renal transport of organic solutes; In: Membrane Transport in Biology, Vol. IV a: Transport Organs. Giebisch, G., Tosteson, D. C., Ussing, H. eds.; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 413 - 448, 1980
7. Scriver, C. R., Chesney, R. W., McInnes, R. R.: Genetic aspects of renal tubular transport: Diversity and topology of carriers; Kidney Int. 9, 149 - 171, 1976
8. Murer, H., Kinne, R.: The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes; J. Membrane Biology 55, 81 - 95, 1980
9. Heidrich, H. G., Kinne, R., Kinne-Saffran, E., Hannig, K.: The polarity of the proximal tubule cell in rat kidney. Different surface charges for the brush border microvilli and plasma membranes from basal infoldings; J. Cell. Biol. 54, 232 - 245, 1972

10. Kinne, R.; Polarity of the renal proximal tubular cell. Function and enzyme pattern of the isolated plasma membranes; Med. Clin. of N. A. 59, 615 - 627, 1975
11. Haase, W., Schäfer, A., Murer, H., Koepsell, H., Kinne, R.: Orientation of renal brush border membrane vesicles; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 242, 1977
12. Kinne, R., Murer, H., Kinne-Saffran, E., Thees, M., Sachs, G.: Sugar transport by renal plasma membrane vesicles: Characterization of the system in the brush border microvilli and basal-lateral plasma membranes; J. Membr. Biol. 21, 375 - 395, 1975
13. Evers, J., Murer, H., Kinne, R.: Phenylalanine uptake in isolated renal brush border vesicles; Biochem. Biophys. Acta 426, 598 - 615, 1976
14. Hoffmann, N., Thees, M., Kinne, R.: Phosphate transport by isolated renal brush border vesicles; Pfluegers Arch. 362, 147 - 156, 1976
15. Booth, A. G., Kenny, A. J.: A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney; Biochem. J. 142, 575 - 581, 1974
16. Evers, C., Haase, W., Murer, H., Kinne, R.: Properties of brush border vesicles isolated from rat kidney cortex by calcium precipitation; Membrane Biochem. 1, 203 - 219, 1978
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent; J. Biol. Chem. 193, 265 - 275, 1951
18. Henderson, P. J. F., McGivan, J. D., Chappell, J. B.: The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes; Biochem. J. 111, 521 - 535, 1969
19. Mitchell, P., Moyle, J.: Translocation of some anions, cations and acids in rat liver mitochondria; Eur. J. Biochem. 9, 149 - 155, 1969
20. Murer, H., Hopfer, U., Kinne, R.: Sodium/proton antiport in brush border membrane vesicles isolated from

rat small intestine and kidney; Biochem. J. 154, 597 - 604, 1976

21. Schneider, E. G., Hammermann, M. R., Sacktor, B.: Sodium gradient-dependent L-glutamate transport in renal brush border membrane vesicles. Evidence for an electroneutral mechanism; The Journal of Biological Chemistry Vol 255, No. 16, Issue of August 25, 7650 - 7656, 1980
22. Samarzija, I., Frömter, E.: Electrical studies on amino acid transport across brush border membrane of rat proximal tubule in vivo; Pfluegers Arch. 359, R 119, 1975
23. Chan, A. W. K., Burch, H. B., Alvey, T. R., Lowry, O. H.: A quantitative histochemical approach to renal transport. I. Aspartate and glutamate; Am. J. Physiol. 229, 1034 - 1044, 1975
24. Burckhardt, G., Kinne, R., Stange, G., Murer, H.: The effects of potassium and membrane potential on sodium-dependent glutamic acid uptake; Biochimica et Biophysica Acta 599, 191 - 201, 1980
25. Schneider, E. G., Sacktor, B.: Sodium gradient-dependent L-glutamate transport in renal brush border membrane vesicles. Effect of an intravesicular > extravesicular potassium gradient; The Journal of Biological Chemistry Vol. 255, No. 16, Issue of August 25, 7645 - 7649, 1980
26. Sacktor, B., Rosenbloom, I. L., Liang, C. T., Cheng, L.: Sodium gradient- and sodium plus potassium gradient-dependent L-glutamate uptake in renal basolateral membrane vesicles; J. Membrane Biol. 60, 63 - 71, 1981
27. Kessler, M., Tannenbaum, V., Semenza, G.: A simple apparatus for performing short time (1 - 2 sec.) uptake measurements in small volumes; its application to D-glucose transport studies in brush border vesicles from rabbit jejunum and ileum; Biochim. Biophys. Acta 509, 348 - 359, 1978

28. Hilden, S. A., Sacktor, B.: D-glucose-dependent sodium transport in renal brush border membrane vesicles; The Journal of Biological Chemistry Vol. 254, No. 15, Issue of August 10, 7090 - 7096, 1979
29. Burckhardt, G., Stern, H., Murer, H.: The influence of pH on phosphate transport into rat renal brush border membrane vesicles; Pfluegers Arch. 390, 191 - 197, 1981
30. Cheng, L., Sacktor, B.: Sodium gradient-dependent phosphate transport in renal brush border membrane vesicles; The Journal of Biological Chemistry Vol. 256, No. 4, Issue of February 25, 1556 - 1564, 1981

Herrn Prof. Dr. med. K.-J. Ullrich, Max-Planck-Institut für Biophysik, danke ich für die Überlassung des Themas sowie zahlreiche wertvolle Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Murer, Physiologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz, und Herrn Prof. Dr. med. R. Kinne bedanke ich mich ganz herzlich für die intensive Betreuung bei der Durchführung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche und der Abfassung der Dissertationsschrift.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Biophysik, hier besonders Frau G. Stange, die mich bei der Durchführung der beschriebenen Experimente unterstützten.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

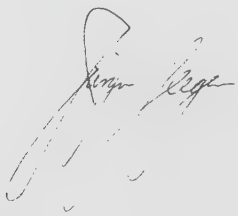
Die Kopplung zwischen Natrium- und Substrattransport in Bürstensaum-membranvesikeln aus dem proximalen Tubulus der Rattenniere:

Beschreibung des L-Glutaminsäure-transports und der substratinduzierten Natriumbewegung in verschiedenen Transportsystemen

im Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K.-J. Ullrich mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Murer und Herrn Prof. Dr. med. R. Kinne ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Offenbach am Main, 9. November 1982



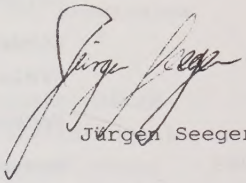
Jürgen Seeger

6050 Offenbach, 9. November 1982
Taunusstr. 78

L E B E N S L A U F

24. Februar 1955	geboren in Gießen als Sohn der Eheleute Friedrich und Hilde Seeger.
April 1961	Einschulung in die Volksschule Wißmar/ Kreis Wetzlar.
April 1965	Wechsel zum Herdergymnasium Gießen.
November 1965 - Frühjahr 1973	Besuch des Leibnizgymnasiums in Offenbach. Hier Abitur im neusprachlichen Zweig.
Wintersemester 1973/74	Beginn des Medizinstudiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
August 1975	Ärztliche Vorprüfung.
August 1976	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
März 1979	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
April 1979 - März 1980	Praktisches Jahr mit Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe im St. Marienkrankenhaus in Frankfurt am Main.
April und Mai 1980	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
Mai 1980	Erteilung der Approbation als Arzt.
Mai bis August 1980	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Kaiserberg-Klinik in Bad Nauheim bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Uhlich.
Januar bis Juni 1981	Afrikareise mit zwei Kollegen, Besuch mehrerer Entwicklungshilfeeinrichtungen, unter anderem vierwöchige Hospitation in einem Missionshospital in Nigeria.
August 1981	Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer.

August bis November 1981	Nebenamtliche Tätigkeit als Arzt beim Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes sowie im Mühlberg-Krankenhaus in Frankfurt am Main.
Seit Dezember 1981	Zivildienst im Zentrum der Kinderheilkunde im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.



Jürgen Seeger